



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DO mRNA *FOSB*, *BDNF* E *DRD5* EM  
SANGUE PERIFÉRICO DE DEPENDENTES DE ÁLCOOL E  
CRACK-COCAÍNA**

**QUÉZIA ANDERS**

Vitória  
2019

**QUÉZIA ANDERS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DO mRNA *FOSB*, *BDNF* E *DRD5* EM  
SANGUE PERIFÉRICO DE DEPENDENTES DE ÁLCOOL E  
CRACK-COCAÍNA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Ester M. Nakamura-Palacios

**Vitória**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Ao Todo Poderoso, Criador do céus e da terra, O Grande EU SOU. Sem Ele, jamais estaria aqui, *“Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém (Romanos 11:36).*

À minha família, por todo carinho, sustento e atenção. Vocês foram, são e sempre serão fundamentais em minha vida!

À minha orientadora, Profa. Ester, por ter me acolhido com tanto carinho e atenção. Sempre disposta a ajudar, valorizando cada parte deste trabalho. Muito obrigada!

Aos parceiros do Laboratório de Neurotoxicologia e Psicofarmacologia, especialmente, Profa. Livia Melo, por toda disposição em ajudar e colaborar com nosso projeto.

Ao Prof. Iúri Drumond por me permitir realizar os experimentos de biologia molecular no Núcleo de Genética Humana e Molecular (NGHM), constantemente disposto a discutir resultados e dar dicas importantes para a realização deste trabalho.

Às queridas do NGHM, Elaine, Raquel Reis, Raquel S., Elda, Fernanda e aos demais parceiros de iniciação científica, por tamanha e admirável disposição em me acolher, ajudando em cada detalhe da execução dos experimentos, além da simpatia de todos os dias. Muito obrigada!

À querida Jaisa, parceira de doutorado e projeto, por toda simpatia, amizade e disposição em todos os momentos! E aos alunos incríveis que nos acompanharam e ajudaram nesse processo: Leonardo, Luna, Matheus, Renzo, Natana e Fernanda.

Aos professores que compõem a banca pela disponibilidade em aceitar o convite e contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Escute os sábios e procure entender o que eles ensinam. Sim, peça sabedoria e grite pedindo entendimento. Procure essas coisas, como se procurasse prata ou um tesouro escondido. Se você fizer isso, saberá o que quer dizer temer o Senhor, e aprenderá a conhecê-lo. É o Senhor quem dá sabedoria; a sabedoria e o entendimento vêm dele.”*

(Provérbios 2:2-6)

## RESUMO

O uso crônico de drogas tem sido associado com mudanças na expressão gênica no cérebro, produzindo mudanças nos circuitos neurais à longo prazo, resultando em comportamento compulsivo ou *craving*. Evidências sugerem que a droga pode induzir neuroadaptações complexas após a exposição e essas alterações são mediadas por um padrão dinâmico de regulação gênica. Tem-se relatado que as mudanças nos circuitos neurais começam após a primeira exposição, alterando a expressão de genes importantes para o estado de dependência. Nós estudamos a expressão gênica do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) *FosB* (homólogo B do oncogene viral de osteossarcoma murino), *BDNF* (fator neutrófico derivado do cérebro) e *DRD5* (receptor de dopamina D5) em pacientes dependentes internados para tratamento clínico. Para a análise molecular, foi coletado sangue periférico em tubo com anticoagulante e a extração de RNA dos linfócitos não passou de 2 horas após a coleta. O RNA foi usado para a síntese de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar) o qual foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real usando o *primer* específico. Houve uma expressão reduzida de mRNA *FosB* visto o *fold-change* calculado ter sido de -1,15 em dependentes de crack-cocaína (CUD) e de -2,17 em dependentes de álcool (AUD) quando comparados a controles não dependentes. O tamanho do efeito  $g_s$  de *Hedge* do Log *FosB/Act* foi de 0,66 (efeito médio de acordo com a convenção de Cohen) para o CUD e 0,3 (efeito pequeno) para o AUD. Entretanto, houve um aumento da expressão dos mRNAs *BDNF* e *DRD5* em ambos grupos CUD e AUD comparados aos controles. O *fold-change* da expressão de mRNA *BDNF* para o CUD foi de 2,25 e de 2,0 para o AUD, e o tamanho do efeito  $g_s$  de *Hedge* do Log de *BDNF/Act* foi de 0,35 e 0,36 (efeitos pequenos para médios) respectivamente. O *fold-change* da expressão do mRNA *DRD5* foi de 2,22 para ambos os grupos CUD e AUD, e o tamanho do efeito  $g_s$  de *Hedge* do Log de *DRD5/Act* foi de 0,25 e 0,26 (efeitos pequenos), respectivamente. Esses dados sugerem que é possível a detecção de mudanças da expressão gênica de ocorrência central em linfócitos presentes no sangue periférico e estas mudanças podem refletir as alterações moleculares que ocorrem nos circuitos neurais na dependência química.

Palavras-chave: Expressão de mRNA, *FosB*, *BDNF*, *DRD5*

## ABSTRACT

Chronic drug use has been associated with changes in gene expression in the brain, yielding long-term neural circuit changes resulting in compulsive behavior or craving. Evidence suggests that the drug may induce complex neuroadaptations after exposure and these changes are mediated by a dynamic pattern of gene regulation. It has been reported that changes in neural circuits begin after the first exposure, altering the expression of genes important for the state of dependence. We studied the gene expression of mRNA (messenger ribonucleic acid) *FosB* (B-cell homolog of murine osteosarcoma viral oncogene), *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor) and *DRD5* (dopamine D5 receptor) in dependent patients hospitalized for clinical treatment. For molecular analysis, peripheral blood was collected in an anticoagulant tube, and the extraction of RNA from the lymphocytes did not exceed 2 hours after collection. RNA was used for the synthesis of cDNA (complementary deoxyribonucleic acid) which was amplified by PCR (real-time polymerase chain reaction) using the specific primer. There was a reduced *FosB* mRNA expression since the fold-change calculated was -1.15 in crack-cocaine dependents (CUD) and -2.17 in alcohol dependents (AUD) compared to non-dependent controls. The *Hedge's* effect size  $g_s$  of the Log *FosB/Act* was of 0.66 (medium effect size according to Cohen's convention) the CUD and of 0.3 (small effect size) for the AUD. However, there was an increase in the expression of *BDNF* and *DRD5* mRNAs in both CUD and AUD groups compared to controls. The fold-change of the *BDNF* mRNA expression for the CUD was 2.25 and 2.0 for the AUD, and the *Hedge's*  $g_s$  effect size of the Log *BDNF/Act* of 0.35 and 0.36 (small to medium effect size), respectively. The fold-change of *DRD5* mRNA expression was 2.22 for both CUD and AUD groups, and the *Hedge's*  $g_s$  effect size of the Log *DRD5/Act* of 0.25 and 0.26 (small effect size), respectively. These data suggest that it is possible to detect changes in gene expression of central occurrence in lymphocytes present in the peripheral blood and these changes may reflect the molecular changes that occur in neural circuits in drug addiction.

Keywords: mRNA expression, *FosB*, *BDNF*, *DRD5*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AVT, área tegmental ventral

AUD, do inglês *alcohol use disorder* (transtorno do uso de álcool)

CPF, córtex pré-frontal

CUD, do inglês *cocaine use disorder* (transtorno do uso de crack-cocaína)

BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor* (fator neurotrófico derivado do cérebro)

cDNA, do inglês *complementary deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

CREB, do inglês *cAMP response element-binding* (elemento de ligação ao 3'5 adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC))

CT, do inglês *cycle threshold* (limiar do ciclo)

DRD5, do inglês *dopamine receptor D5* (receptor de dopamina D5)

EDTA, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetraacético)

FosB, do inglês *murine osteosarcoma viral oncogene homolog B* (homólogo do oncogene viral de osteossarcoma murino)

FAB, do inglês *The Frontal Assessment Battery*

HAM-D, do inglês Hamilton Depression Rating Scale

HAM-A, do inglês Hamilton Anxiety Rating Scale

Log, logaritmo

mRNA, do inglês *messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucleico mensageiro)

MeCP2, do inglês *methyl CpG-binding protein 2* (proteína 2 de ligação ao Metil-CpG)

MMSE, do inglês *Mini-Mental Status Examination*

NAc, do latim *nucleus accumbens* (núcleo accumbens)

OCDS, do inglês Obsessive-Compulsive Drinking Scale

OCCS, do inglês Obsessive Compulsive Cocaine Scale

RT-PCR, do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction* (reação da transcriptase reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1 DEPENDÊNCIA QUÍMICA .....	11
1.2 DISFUNÇÕES EXECUTIVAS NA DEPENDÊNCIA QUÍMICA .....	11
1.3 ALTERAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS NA DEPENDÊNCIA QUÍMICA .....	12
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 ALVOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DEPENDÊNCIA QUÍMICA .....	16
2.1.2 Possíveis alterações epigenéticas geradas após exposição à drogas ..	18
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	21
3.1.2 Objetivos específicos .....	21
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>23</b>
4.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE .....	23
4.1.2 Testes cognitivos .....	23
4.2 COLETA DE SANGUE .....	25
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA .....	25
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL – RT-PCR .....	27
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DOS SUJEITOS .....	32
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA PARA O GENE <i>FosB</i> EM PACIENTES USUÁRIOS DE CRACK, ÁLCOOL E CONTROLES .....	35
5.2.1 Associação da expressão do gene <i>FosB</i> com os testes cognitivos em todos os sujeitos .....	36
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA PARA O GENE <i>BDNF</i> EM PACIENTES USUÁRIOS DE CRACK, ÁLCOOL E CONTROLES .....	37
5.3.1 Associação da expressão do gene <i>BDNF</i> com testes cognitivos em todos os sujeitos .....	39
5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO RELATIVA PARA O GENE <i>DRD5</i> EM PACIENTES USUÁRIOS DE CRACK, ÁLCOOL E CONTROLES .....	40



5.4.1 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>DRD5</i> COM TESTES COGNITIVOS EM TODOS SUJEITOS .....	41
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>54</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
ANEXO I – ARTIGO .....	65
ANEXO II – DSM IV .....	68
ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLES).....	69
ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES).....	71
ANEXO V – BATERIA DE AVALIAÇÃO FRONTAL (FAB) .....	73
ANEXO VI - MINI EXAME DO ESTADO MENTAL .....	74
ANEXO VII – QUESTIONÁRIOS DO PADRÃO DE COMPULSÃO ( <i>CRAVING</i> )..	75
ANEXO VIII – ESCALA DE HAM - D .....	77
ANEXO IX – ESCALA DE HAM - A.....	79

# INTRODUÇÃO

---

## **1 Introdução**

### **1.1 Dependência Química**

Em março de 2016, a 59<sup>a</sup> sessão da Comissão sobre Drogas Narcóticas do Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crimes (UNODC) da Organização Mundial da Saúde relatou que 1 entre 20 pessoas de idades entre 15 e 64 anos usaram uma droga ilícita em 2013. Aproximadamente 1 em 10 pessoas que usaram drogas ilícitas, sofre de algum transtorno do uso de drogas (UNODOC-WHO, 2016).

O transtorno do uso de drogas é um termo diagnóstico para o abuso de drogas e a dependência é definida como um transtorno mental. Assim, a dependência química está classificada entre os transtornos psiquiátricos, sendo considerada uma doença crônica multifatorial. Como tal, a dependência é caracterizada como progressiva, incurável, porém tratável relativamente, apesar das consequências significativas para o dependente (FISCHER et al., 2015).

A dependência de drogas é uma condição que abrange uma porção pequena dos usuários (cerca de 10%), entretanto esse número torna-se significativo considerando o nível de alteração comportamental que o indivíduo dependente apresenta (UNODC-WHO, 2016). Nesses indivíduos susceptíveis, o consumo repetido da substância induz um padrão de uso compulsivo com consequente perda de controle do uso e desejo incontável (fissura ou mais frequentemente referido na literatura como *craving*) para o uso da substância, estabelecendo e mantendo um padrão aditivo, caracterizado pelo uso excessivo da droga, além de gasto exagerado de tempo em atividades relacionadas à busca pela substância (SANCHIS-SEGURA; SPANAGEL, 2006).

### **1.2 Disfunções executivas na dependência química**

A deficiência ou hipoatividade das funções executivas frontais tais como: planejamento de ações futuras, direcionamento do comportamento em torno de um objetivo, resolução de problemas, tomada de decisões, inibição de respostas

inadequadas, memória operacional (ou de trabalho), são características comportamentais que estão presentes em dependentes de drogas (GEORGE; KOOB, 2013).

A falha em controlar respostas inadequadas (comportamento inibitório) compromete o controle pelo desejo da droga, resultando no consumo compulsivo. Bem como, a autoconsciência alterada, interfere no reconhecimento de que o uso da droga é uma doença e precisa de tratamento. Por fim, todas essas mudanças comprometem profundamente a função social do indivíduo (VOLKOW et al., 2012)

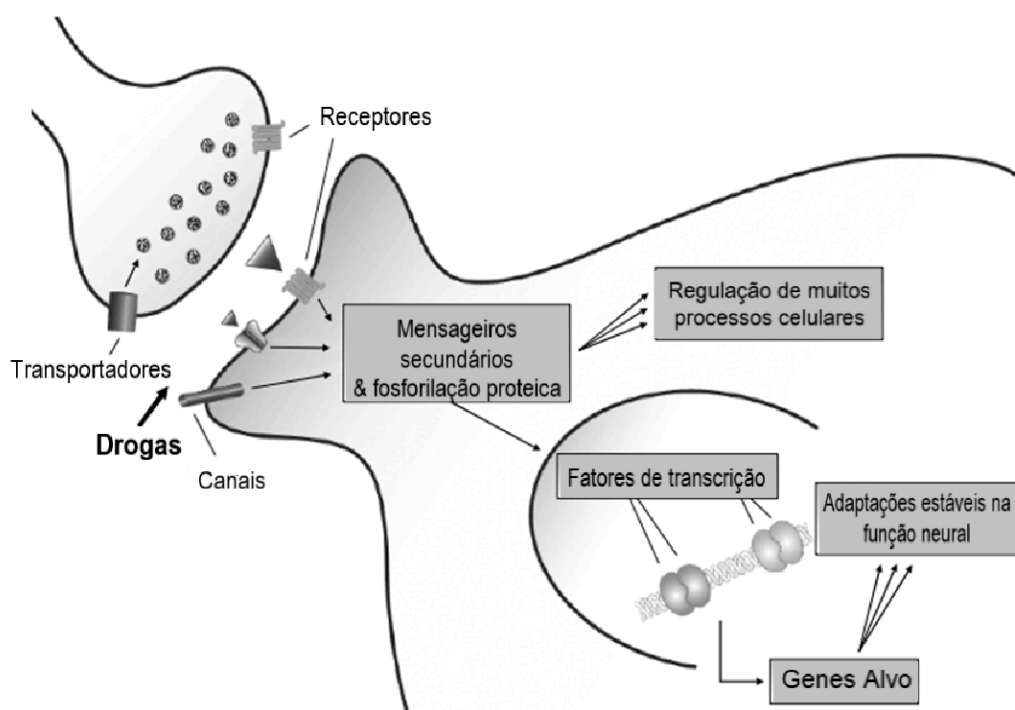
### **1.3 Alterações moleculares envolvidas na dependência química**

O uso de drogas aditivas tem sido associado à alteração da expressão gênica no cérebro, resultando em mudanças de longo prazo nas sinapses, nos circuitos neurais, bem como consequentes alterações neuroadaptativas e comportamentais, promovendo a tolerância e o aumento do comportamento de busca pela droga, que podem estar subjacentes ao desenvolvimento e manutenção da dependência química (GUJEWSKI et al., 2016; SCHMIDT; MCGINTY; WEST, 2013; NESTLER, 2008).

Substâncias químicas (cocaína, álcool, morfina, canabinóides e outros) ou atividades gratificantes (ex.: jogos, sexo) são conhecidas por ativar o circuito de recompensa no cérebro, ou seja, ativação de neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (AVT) do mesencéfalo e suas projeções para o sistema límbico: núcleo accumbens, estriado dorsal, amígdala, hipocampo e cortex pré-frontal (ROBISON; NESTLER, 2011).

Segundo Nestler (2012), a ativação da droga em receptores do circuito de recompensa ativa sinapses excitatórias, aumentando a permeabilidade de canais de cálcio e ativando segundos mensageiros no meio intracelular desses neurônios. Estes segundos mensageiros alcançam o núcleo, ativando a transcrição da proteína de ligação em resposta ao AMPc (CREB) em curto tempo de exposição ao psicoestimulante. A ativação de CREB aumentada, ativa a transcrição de outros

genes como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), dinorfinas (opióides endógenos) e família Fos, como o FosB. As alterações nos níveis de transcrição desses genes iniciam e desenvolvem o estado de dependência (Fig. 1).



**Figura 1:** Ações transcricionais das drogas de abuso. Embora as drogas tenham seus alvos proteicos imediatos, à longo prazo, esses efeitos são regulados por segundos mensageiros ativados no interior dos neurônios. No núcleo, a regulação de genes específicos ativados pela droga, levam à comportamentos anormais que caracterizam a dependência (NESTLER, 2012).

Não há, no entanto, nenhum estudo em humanos que tenha investigado se essas mudanças neuronais desenvolvidas na dependência podem ser medidas a nível molecular. Assim, considerando a hipótese de que os linfócitos presentes no sangue periférico serviriam como “sondas” que reproduzem as alterações da expressão gênica observadas nos circuitos neurais (VOUSOOGHI et al., 2015) este trabalho propõe-se a investigar a expressão gênica de genes-alvos no desenvolvimento e manutenção do estado de dependência em pacientes internados para o tratamento da dependência química.

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

## 2 Fundamentação Teórica

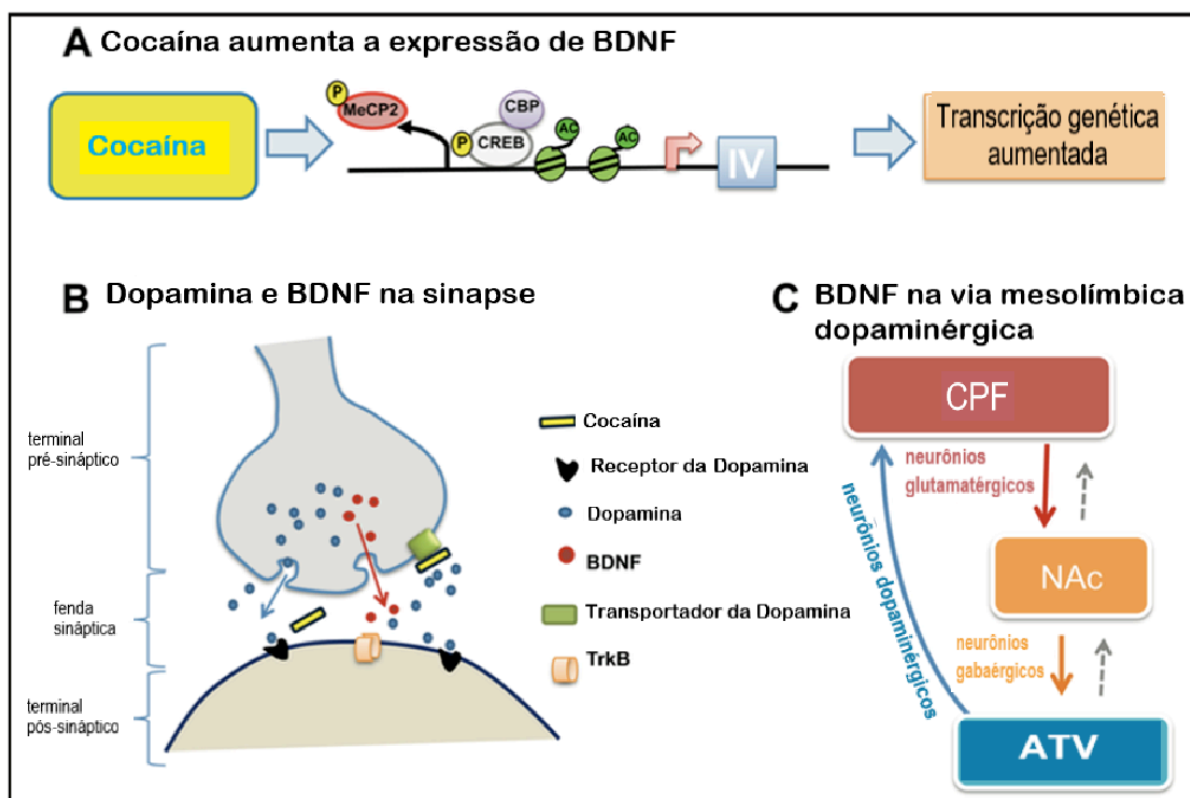
### 2.1 Alvos moleculares envolvidos na dependência química

O “estado de dependência” é uma condição mental que possui um componente genético associado ao contexto psicológico/social do indivíduo no momento da exposição à droga (ROBISON; NESTLER, 2011).

O longo tempo de exposição à droga, faz com que mecanismos de regulação epigenéticos ocorram influenciados pela substância, promovendo alterações nos circuitos de recompensa cerebral, especialmente neurônios dopaminérgicos e suas projeções para o sistema límbico, altamente estimulado durante o uso de drogas (NESTLER, 2008).

Tem-se relatado na literatura que substâncias psicoativas como cocaína, álcool, anfetaminas e outras, podem fosforilar proteínas reguladoras de transcrição como CREB e MeCP2 (do inglês, *methyl CpG-binding protein 2*). Uma vez fosforiladas, estas proteínas “liberam” sítio de transcrição do éxon IV da proteína BDNF, proteína capaz de promover alterações estruturais nos circuitos neuronais (Fig. 2). Ainda como efeito cascata dessas alterações moleculares após o uso de drogas, genes responsáveis por iniciar o ciclo celular como os da família Fos, especialmente o FosB, têm sua expressão alterada logo nas primeiras exposições à droga, podendo permanecer alterados por período indeterminado, além de promover repressão ou ativação de outros genes-alvos (NESTLER, 2008; NESTLER, 2012; MCCARTHY et al., 2012; MOST et al., 2014).





**Figura 2:** Alterações induzidas pela cocaína na expressão de BDNF na via dopaminérgica mesolímbica.

**A:** A Ativação da expressão gênica induzida pela cocaína na região promotora do exon IV do BDNF é facilitada pela fosforilação de CREB e associação de CREB fosforilada com a proteína de ligação a CREB. Subsequentemente, a MeCP2 fosforilada é dissociada do DNA metilado e as histonas tornam-se acetiladas, resultando em cromatina transcricionalmente ativa.

**B:** Exemplo simplificado de alterações induzidas pela cocaína no BDNF e na sinapse dopaminérgica. A cocaína liga-se ao transportador de dopamina do terminal pré-sináptico dos neurônios dopaminérgicos, bloqueando a recaptação da dopamina aumentando a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica. O aumento da liberação de BDNF dos neurônios dopaminérgicos da AVT (área tegmental ventral) tem sido associado ao comportamento de busca por drogas.

**C:** A exposição repetida à cocaína leva ao aumento da expressão do BDNF na via mesolímbica. O BDNF é liberado dos neurônios dopaminérgicos da AVT (azul), dos neurônios glutamatérgicos do CPF (córtex pré-frontal) (vermelho) e dos neurônios GABAérgicos do NAc (núcleo accumbens) (laranja). Linhas coloridas representam o

transporte anterógrado de um tipo específico de célula e as linhas cinzas pontilhadas representam o transporte retrógrado do BDNF (MACCARTHY et al., 2012).

Uma vez que a finalidade do uso de drogas é a estimulação de neurônios dopaminérgicos, principalmente localizados na AVT e suas projeções para o núcleo accumbens, amígdala e hipocampo (MCCARTHY et al., 2012), a análise do receptor de dopamina ligado à proteína G estimulante D5, foi sugerida como importante alvo neste trabalho.

Os receptores dopaminérgicos D5 estão presentes, principalmente, no hipocampo e no tálamo. Além disso, esses receptores também são encontrados nos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos na AVT (BUTTARELLI et al., 2011).

Pesquisadores relatam que receptores do tipo D1 (D1-D5) ligados à proteína G estimulante, sejam componentes importantes na via de aprendizagem relacionada à recompensa mesolímbica (GOODARZI et al., 2009).

Além disso, devido à grande afinidade (10 vezes maior) do receptor D5 pela dopamina, é coerente assumir que esses receptores possuem papel importante no desenvolvimento da dependência (VOOUSOOGHI et. al, 2015).

### **2.1.2 Possíveis alterações epigenéticas geradas após exposição à drogas**

Epigenética literalmente significa “acima do genoma”, ou seja, modificações químicas do DNA e das histonas, promovendo mudanças na transcrição sem alterar a sequência do DNA (MCCARTHY et al., 2012).

A modificação da cauda da histona (proteína chaperona que protege e enovela o DNA) consiste no processo de acetilação, ou seja, retirada da carga positiva da histona, liberando o material genético para a transcrição. Já o processo de metilação da histona, consiste em tornar essa proteína novamente positiva, reprimindo o gene que ela envolve. Essas alterações químicas ocorrem devido à exposição aguda à drogas e são sugeridas como responsáveis por alterar genes específicos envolvidos na dependência (NESTLER, 2008).

Neuroadaptações e alterações transcricionais induzidas por drogas influenciam uma complexa rede regulatória que controla como e quando os mRNA sinápticos são traduzidos (MOST et al., 2014).

As alterações transcricionais podem ser transitórias ou persistentes, são reguladas à longo prazo e são críticas para as respostas adaptativas de um organismo subjacentes a várias modificações no comportamento, incluindo a dependência de drogas, e são influenciadas pelo aumento da síntese e liberação de BDNF (MCCARTHY et al., 2012).

Embora os mecanismos subjacentes à dependência de drogas sejam complexos, há uma forte correlação entre exposição à drogas de abuso como cocaína, anfetamina, álcool e neuroadaptações no sistema dopaminérgico (MOST et al., 2014). Essas adaptações ocorrem devido a tais compostos psicoestimulantes interferirem na sinalização dopaminérgica, elevando os níveis de dopamina na sinapse. A administração repetida de drogas pode causar mudanças permanentes nos níveis de dopamina, bem como alterações transitórias ou permanentes na expressão do BDNF, implicando em alterações neuronais de longa duração induzida por drogas (MCCARTHEY et al., 2012).

As alterações moleculares à nível de expressão gênica observadas durante o estado de dependência química e que são subjacentes às alterações nos circuitos neuronais, podem refletir na mudança do comportamento observados nos quadros de dependência química, sendo assim, alvo do presente estudo.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar os níveis de expressão gênica de genes-alvos no estado de dependência química *FosB*, *BDNF* e *DRD5* em sangue periférico de indivíduos internados para o tratamento da dependência de drogas, comprovando a possível relação entre as alterações moleculares determinantes no processo de dependência que ocorrem no sistema nervoso central e as alterações observadas em linfócitos como “sondas” que evidenciam esses processos à nível periférico.

##### 3.1.2 Objetivos específicos

- Comparar os níveis de expressão dos genes *FosB*, *BDNF* e *DRD5* em sangue periférico de dependentes químicos internados para o tratamento da dependência e controles não-usuários pareados pelas características sócio-demográfica.
- Avaliar se os níveis de expressão gênica observados possuem correlação com o estado clínico de dependência química mensurados por testes cognitivos.

## **METODOLOGIA**

---

## 4 Metodologia

### 4.1 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos participantes de ambos os gêneros entre 18 e 75 anos que estavam internados no Hospital da Polícia Militar do Estado do Espírito Santo e apresentavam diagnóstico de dependência de crack-cocaína (grupo CUD de *cocaine use disorder*) ou de álcool (grupo AUD de *alcohol use disorder*) de acordo com os critérios do Manual de Estatística e Diagnóstico de transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders - DSM-5* (anexo I); estavam em abstinência em um intervalo mínimo de 24 horas e no máximo 90 dias podendo fazer uso de nicotina e/ou cafeína e encontravam-se estáveis. Além disto, os pacientes deveriam ser capazes de ler, escrever, bem como assinarem termo de consentimento livre e esclarecido (anexo II/III) aceitando a inclusão no projeto de pesquisa e doação de 5 ml de sangue periférico usado nas análises de expressão gênica.

Também foram incluídos no estudo indivíduos saudáveis que não apresentavam história e/ou critérios para o diagnóstico de dependência química ou outros transtornos mentais, portanto, não sendo usuários e/ou dependentes químicos ou apresentando desordens neuropsiquiátricas, pareados pelas características sócio-demográficas (idade, gênero, escolaridade, nível sócio-econômico, etc.) que foram utilizados como controles (grupo CONT) para os testes de expressão gênica.

#### 4.1.2 Testes cognitivos

Os participantes incluídos no estudo passaram por avaliação clínica psiquiátrica prévia conferindo o critério para diagnóstico da dependência química, por uma entrevista estruturada para coletar as informações sócio-demográficas e padrões de uso das substâncias e avaliação cognitiva breve mediante aplicação de uma bateria de avaliação da função frontal e o mini-exame do estado mental.

A FAB (*The Frontal Assessment Battery*) avalia seis diferentes domínios de função executiva: conceitualização, flexibilidade mental, programação motora, sensibilidade

à interferência, controle inibitório e autonomia (anexo IV) (CUNHAS; NOVAES, 2004). Cada item é pontuado de zero a três, totalizando uma soma de dezoito pontos para a pontuação máxima.

Para rastreamento do estado mental do indivíduo foi usado a escala cognitiva do Mini-exame do estado mental - MMSE do original *Mini-Mental Status Examination*. Esta escala avalia pelo menos cinco funções cognitivas: orientação, registro, atenção e cálculo, evocação e linguagem (anexo V) (BERTOLICCI et al., 1994).

Os indivíduos saudáveis que aceitaram ser incluídos no estudo também realizaram os testes cognitivos descritos acima, além de assinarem o termo de consentimento de forma similar aos indivíduos dependentes.

Para avaliação clínica específica dos pacientes alcoolistas e usuários de crack-cocaína, foi realizado um exame que avalia o desejo intenso (*craving*) pela droga e, tanto para alcoolistas quanto para os CUD, foram aplicadas escalas que avaliaram os níveis de depressão e ansiedade.

O *craving* foi pontuado com uma escala breve composta de 5 itens (1, 2, 4, 5 e 13) adaptada da Escala de Beber Obsessivo-Compulsivo (OCDS) (ANTON et al., 1995; ANTON et al., 1996; ANTON, 2000) para AUD, e da Escala de Cocaína Obsessivo-Compulsivo (OCCS) (VORSPAN et al., 2012) para CUD, que avalia o desejo pela droga em um sentido restrito de acordo com De Wildt et al. (2005). As questões desta escala breve são respondidas em uma escala que varia de 0 a 4, resultando em uma pontuação total entre 0 e 20.

A gravidade dos sintomas de depressão foi analisada por um questionário de múltipla escolha (Escala de HAM-D). Este instrumento avalia a gravidade dos sintomas de depressão, como baixo humor, insônia, agitação, ansiedade e perda de peso (Hamilton, 1960). O examinador deve escolher entre as respostas possíveis para cada questão entrevistando o paciente e observando os sintomas do paciente. Cada questão tem entre 3 e 5 possíveis respostas que aumentam em gravidade. Na escala original, as primeiras 17 questões contribuem para a pontuação total, enquanto as questões 18 a 21 fornecem informações adicionais sobre depressão



(por exemplo, variação diurna, sintomas paranóides), mas não são incluídas na pontuação total da escala.

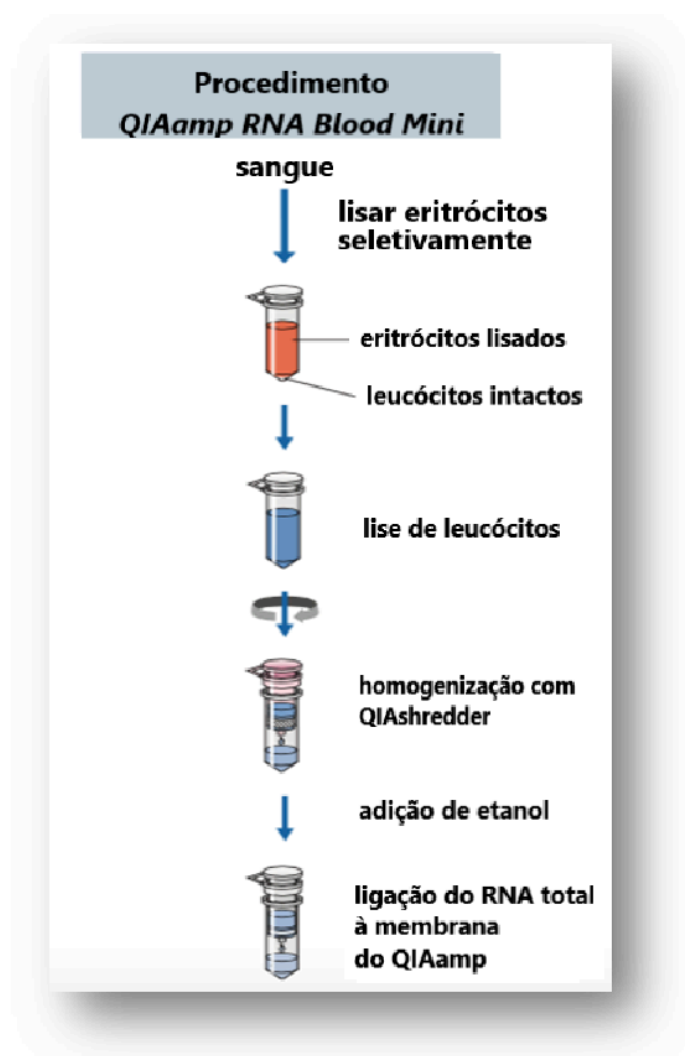
O nível dos sintomas de ansiedade foram avaliados por meio de um questionário estruturado de múltipla escolha (Escala de HAM-A) (Hamilton, 1959). A escala consiste em 14 itens, cada um deles definido por uma série de sintomas, e mede tanto a ansiedade psíquica (por exemplo, agitação mental e angústia psicológica) quanto a ansiedade somática (por exemplo, queixas físicas relacionadas à ansiedade).

#### **4.2 Coleta de sangue**

Foram coletados 5 ml de sangue periférico por punção venosa em seringas estéreis de 10 ml e agulhas estéreis de 27 milímetros de espessura. Após a punção, o sangue foi introduzido em tubo contendo o anticoagulante EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*) e mantido em temperatura ambiente e recipiente adequado até a chegada no laboratório para extração de RNA. O tempo entre a coleta e o processo de extração de RNA não foi superior a 2 horas.

#### **4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA**

A extração de RNA total a partir de sangue foi feita pelo método de colunas (Fig.3), utilizando o Qiamp Blood RNA Mini Kit (Cat. No. 52304, Qiagen, Alemanha) e seguido protocolo disponibilizado pelo fabricante. Após a extração, o RNA foi eluído em água livre de RNase armazenado em freezer a -80 °C.



**Figura 3:** Ilustração do método de extração de RNA total em colunas fornecido pelo fabricante (Cat. No. 52304, Qiagen, Alemanha).

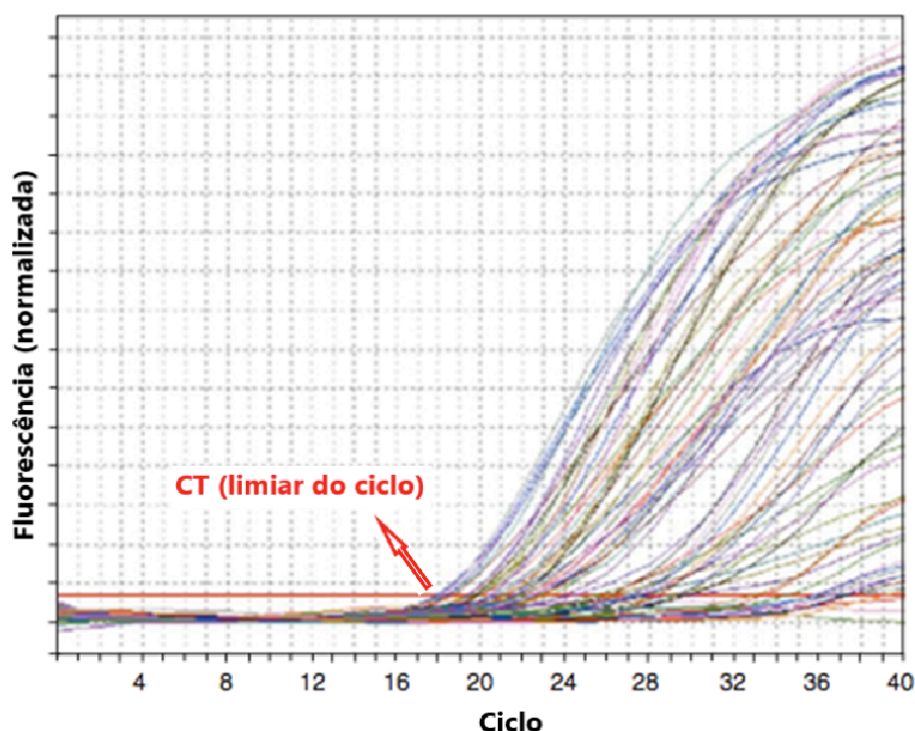
Posteriormente, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop 2000 Thermo Fisher Cientific, EUA) para averiguar quantidade de material extraído. Em seguida, 400 nanogramas de RNA total foram utilizados para a transcrição reversa (RT) utilizando-se o *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* (Cat. No. 330404, Qiagen, Alemanha). O total de cDNA sintetizado após o processo de RT foi diluído em 1:3 em água livre de RNase própria do kit e armazenado em freezer a -20 °C.

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real – RT-PCR

Para avaliação dos níveis de expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-PCR, na qual foram utilizadas três amostras de cDNA (tréplicas biológicas) do mesmo indivíduo para cada reação. O método de detecção da amplificação das regiões de interesse utilizado foi o RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix (Cat. No. 330620, Qiagen, Alemanha) e *ABI PRISM 7500 Sequence Detection Systems* (Applied Biosystems, EUA).

A quantidade de mix de RT-PCR utilizado para cada um dos poços das reações foi de 5 µl; 2,6 µl de água estéril; 0,4 µl de primer personalizado e 2 µl de cDNA diluído de cada paciente em tréplicas.

Em todas as reações foi utilizado o primer para gene *housekeeping* ou de referência o da *βActin* (NM\_001101.3, Qiagen, Alemanha), seguido do primer do gene de interesse *FosB* (NM\_006732.2, Qiagen, Alemanha), *BDNF* (NM\_001709.4, Qiagen, Alemanha) e *DRD5* (NM\_000798.4, Qiagen, Alemanha). A média dos valores CT (*Cycle Threshold*, Fig. 4) entre o gene *housekeeping* e o gene de interesse para cada grupo (dependentes e controles), foram utilizadas para a quantificação relativa da expressão gênica.



**Figura 4:** Ilustração do valor de CT, correspondente ao número de ciclos da RT-PCR que são necessários para que a quantidade de cDNA das amostras rompa o limiar de detecção da fluorescência (Adaptado de NOLAN et al., 2006).

#### 4.5 Análise estatística

Para a comparação da idade entre os grupos CONT, CUD e AUD foi empregada uma análise de variância (ANOVA), e as comparações de outras características sociodemográficas (gênero, escolaridade, estado civil, situação trabalhista e uso de tabaco) foram feitas por testes não-paramétricos (Qui-quadrado).

As diferenças de expressão relativa observadas entre o grupo controle e os grupos dependentes foram obtidas utilizando a média dos valores de CT de cada grupo, usando como gene de referência a *βActina*, além dos genes-alvos *FosB*, *BDNF* e *DRD5*. Em seguida, fez-se o cálculo de *fold-change* como proposto por Schmittgen e Livak (2008):

$$2^{-\Delta CT_{depend}} / 2^{-\Delta CT_{control}}$$

O resultado desse cálculo evidencia quantas vezes o gene em estudo está expresso em relação ao gene normalizador ou de referência. Entretanto, caso a média do CT no grupo controle seja menor do que a observada no grupo tratamento ou, no caso, dependentes, significa que o valor encontrado do *fold-change* é negativo, representando uma redução da expressão gênica (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

A proporção dos valores de CT dos genes de *FosB*, *BDNF* e *DRD5* sobre o CT do gene de referência *Beta-Actina* (Act) (*FosB/Act*, *BDNF/Act* e *DRD5/Act*) foi convertida em logaritmo na base 10 (Log *FosB/Act*, Log *BDNF/Act* e Log *DRD5/Act*) de acordo com Yamada et al. (2013) para cada sujeito para as análises da expressão do mRNA destes genes entre os grupos. Estes dados foram representados pela média e erro padrão da média (e.p.m.).

Assim, para a comparação dos Logs *FosB/Act*, *BDNF/Act* e *DRD5/Act* entre os grupos CONT, CUD e AUD, foi empregada uma análise de covariância (ANCOVA) tendo idade e uso de tabaco como covariáveis (SULLIVAN et al., 2001), visto que estas variáveis poderiam influenciar na expressão dos genes, mesmo que estas variáveis não tenham se diferenciado entre os grupos.

Para a verificação de uma possível associação do desempenho executivo (FAB) e cognitivo global (MMSE) e os genes pesquisados, foram realizadas análises de regressão múltipla corrigidas pela idade e escolaridade, visto que estas variáveis poderiam influenciar o desempenho cognitivo (CRUM et al., 1993) tendo os escores da FAB e do MMSE como potenciais preditores dos Logs *FosB/Act*, *BDNF/Act* e *DRD5/Act* como variáveis dependentes analisados individualmente. Para estas análises foram introduzidos todos os sujeitos envolvidos no estudo.

Adicionalmente, os tamanhos de efeito foram calculados usando Cohen d porém corrigido para amostra populacional por Hedge  $g_s$  (LAKENS, 2013) para comparação entre amostras independentes (teste t não-pareado) dos valores dos Logs *FosB/Act*, *BDNF/Act* e *DRD5/Act*.

Em todas as análises foi empregado um nível de significância para  $p < 0,05$ . O SPSS *Statistics Base 24.0* (SPSS Inc, EUA) e o *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad

Software Inc, EUA) foram utilizados para análise estatística e apresentações gráficas, respectivamente.

## **RESULTADOS**

---

## **5 Resultados**

### **5.1 Características sociodemográficas dos sujeitos**

O grupo CONT apresentou uma média de idade aproximadamente 5 anos acima dos grupos CUD e AUD, mas a ANOVA não encontrou diferença significativa na comparação entre os grupos (Tab. 1). O grupo AUD teve uma maior proporção de mulheres, porém esse dado não foi estatisticamente significativo na comparação entre os grupos. Além disso, os grupos AUD e CUD apresentaram uma maior proporção de tabagistas, entretanto, na comparação entre os grupos, essa diferença não foi significativa. Assim, os grupos CONT, AUD, CUD apresentaram bom pareamento para idade, gênero e uso de tabaco.

Entretanto, as outras características sociodemográficas como a escolaridade, situação trabalhista e estado civil, não foram equivalentes entre os grupos (Tab. 1).

De um modo geral, a maior parte dos grupos deste estudo foi constituída por indivíduos de boa a elevada escolaridade. A escolaridade mensurada por anos de estudo foi diferente entre os grupos ( $p < 0,05$ ), possivelmente, em decorrência da maior proporção de pacientes com escolaridade de grau médio no grupo AUD em contraste com a maior proporção de indivíduos com maior grau de escolaridade nos grupos CONT e CUD.

A situação trabalhista foi significativamente diferente entre os grupos ( $p < 0,001$ ) em função da maior proporção de desemprego e trabalho informal em contraste com a menor proporção de trabalho formal nos grupos CUD e AUD.

Houve, ainda, diferença significativa quanto ao estado civil ( $p < 0,01$ ) visto que houve uma maior proporção de sujeitos casados ou em união estável nos grupos CONT e AUD, diferentemente de boa parte do grupo CUD, que foi constituída por pacientes que eram solteiros ou viúvos.



Estas diferenças poderiam ser esperadas na população de dependentes de crack-cocaína e álcool como consequências social e comportamental usualmente encontradas nos transtornos do uso de substâncias.

Com relação aos padrões do uso de drogas, os pacientes que constituíram os grupos CUD e AUD e que se encontravam internados em um hospital público para o tratamento da dependência química, apresentaram um uso bastante elevado de álcool (doses/dia) e de crack-cocaína (pedras/dia) (Tab.1).

Neste estudo, os pacientes dos grupos CUD e AUD não apresentaram desempenho executivo (FAB) e cognitivo global (MMSE) diferente do grupo CONT. Dessa forma, os grupos deste trabalho também foram pareados pelo desempenho cognitivo.

As pontuações para avaliar depressão (HAM-D) estiveram dentro da faixa considerada normal e as da escala de ansiedade (HAM-A) indicaram sintomas de leve a moderados em ambos os grupos CUD e AUD. Infelizmente, estas escalas não foram aplicadas no grupo CONT.

As pontuações do *craving* mensuradas pelos 5 itens das escalas OCDS para o álcool ou OCCS para o crack-cocaína, foram de leve a moderada intensidade em ambos transtornos do uso de substâncias. As médias das pontuações nestas escalas foram similares às encontradas em estudos prévios (KLAUSS et al., 2014; BATISTA et al., 2015).

Tabela 1 – Características sociodemográficas dos controles saudáveis (CONT, n = 12), usuários de crack (CUD, n = 10) e alcoolistas (AUD, n = 12).

		Grupos				
		CONT (n = 12)	CUD (n = 10)	AUD (n = 12)		p valor
Características sociodemográficas						
Idade [média (DP)]		47,9 (11,2)	42,5 (12,4)	42,3 (9,0)	F(2,33) = 1,0	0,38
Gênero n (%)	Masculino	8 (66,7%)	8 (80,0 %)	5 (41,7 %)	X <sub>2</sub> = 3,58	0,17
	Feminino	4 (33,3%)	2 (20,0%)	7 (58,3 %)		
Anos de educação n (%)	> 5	2 (16,7%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)	X <sub>2</sub> = 12,64	0,049*
	< 6 > 9	3 (25,0 %)	2 (20,0%)	0 (0,0%)		
	< 10 > 13	1 (8,3%)	3 (30,0%)	8 (66,7%)		
	> 13	6 (50%)	5 (50,0%)	2 (16,7%)		
Situação trabalhista n (%)	Trabalho formal	5 (41,7%)	1 (10,0%)	1 (8,3%)	X <sub>2</sub> = 33,53	0,001***
	Servidor público	2 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
	Trabalho informal	0 (0,0%)	1 (10,0%)	0 (0,0%)		
	Desempregado	0 (0,0%)	4 (40,0%)	9 (75,0%)		
	Trabalho Intermitente	0 (0,0%)	4 (40,0%)	1 (8,3%)		
	Trabalho	4 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
	Contrato temporário	1 (8,3%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)		
	Aposentado					
Estado Civil n (%)	Solteiro	2 (16,7%)	3 (33,3%)	5 (41,7%)	X <sub>2</sub> = 20,3	0,009**
	Casado ou união estável	10	1 (10,0%)	6 (50,0%)		
	Divorciado	(83,3%)	2 (22,2%)	0 (0,0%)		
	Viúvo	0 (0,0%)	3 (33,3%)	0 (0,0%)		
	Não declarado	0 (0,0%)	1 (11,1%)	1 (8,3%)		
		0 (0,0%)				
Padrão de uso de drogas						
Quantidade de uso (diária)		0 (0,0)	14,8 (6,9) pedras/dia	23,9 (17,0) drinks/dia		
Idade de início do uso de drogas (anos)		-	33,4 (9,1)	16,6 (5,0)		
Uso de Tabaco <sup>a</sup>	Sim	2 (16,7%)	5 (55,6%)	6 (50,0%)	X <sub>2</sub> = 4,15	0,126
	Não	10 (83,3%)	4 (44,4%)	6 (50,5%)		
Exame Clínico						
FAB <sup>b</sup>		13,3 (3,1)	14,1 (2,7)	12,1 (2,8)	F(2,33)=1,3	0,27
MMSE <sup>b</sup>		28,0 (2,5)	28,3 (2,1)	27,5 (3,6)	7	0,80
HAM-D <sup>c</sup>			6,5 (2,9)	4,3 (1,7)	F(2,33)=0,2	
HAM-A <sup>c</sup>			10,3 (8,4)	9,3 (8,3)		
Craving scores <sup>c</sup>			5,5 (5,6)	6,6 (5,8)	3	

Escores de Craving = 5-itens de OCDS/OCCS, FAB = *Frontal Assessment Battery*, MMSE = *Minimal Status Examination*, HAM-D = *Hamilton Depression*, HAM-A = *Hamilton Anxiety*. a = dados de um sujeito do grupo CUD estava faltando, b = dados de dois sujeitos do grupo CUD estavam faltando e foram imputados por regressão linear, c = dados de quatro sujeitos do grupo CUD e AUD estavam faltando e não foram imputados. \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* = 0,001.

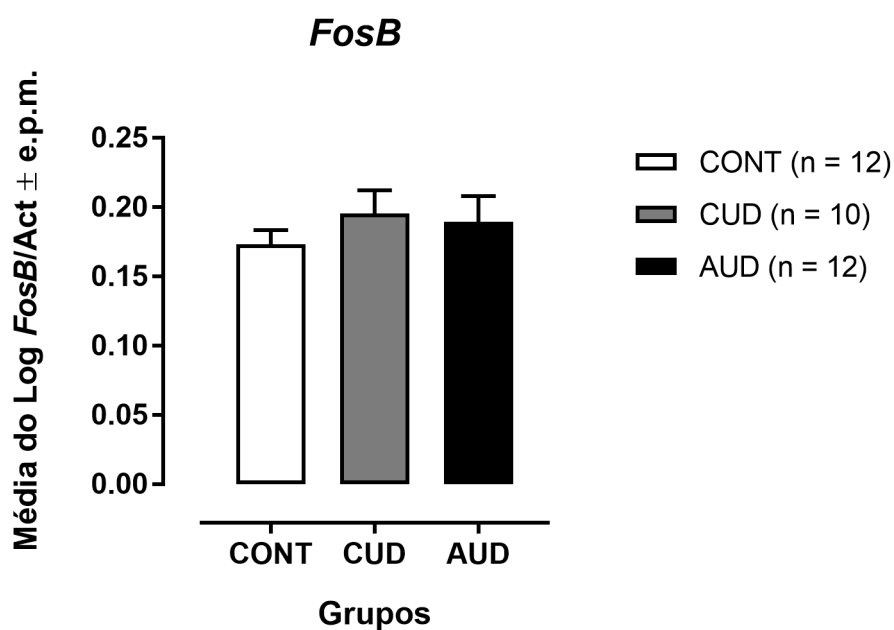
## 5.2 Análise da expressão relativa para o gene *FosB* em pacientes usuários de crack, álcool e controles

A expressão de mRNA de *FosB* foi reduzida, com valor de *fold-change* de -1,15 nos indivíduos CUD e -2,17 nos AUD (Tab. 2). Os sinais negativos no resultado do cálculo de *fold-change* são devido ao  $\Delta$ CT do grupo controle ter sido menor do que os grupos AUD e CUD, indicando que a expressão gênica sofreu redução, seguindo orientações para os cálculos de *fold* de SCHMITTGEN e LIVAK (2008), ou seja,  $-1/\text{fold-change}$  calculado para encontrar quantas vezes houve a redução.

Tabela 2 – Expressão de *FosB* de indivíduos controles (CONT, n = 12), usuários de crack (CUD, n = 10) e alcoolistas (AUD, n = 12).

Expressão de <i>FosB</i>		Grupos		
		CONT (n = 12)	CUD (n = 10)	AUD (n = 12)
<i>Fold change</i> e valores de CT				
Média CT	<i>Beta-Actina</i>	17,03	17,03	16,44
	<i>FosB</i>	25,14	25,34	25,66
$\Delta$ CT		25,14 - 17,03 = 8,11	25,34 - 17,03 = 8,31	25,66 - 16,44 = 9,22
<i>Fold change</i>			-1,15	-2,17

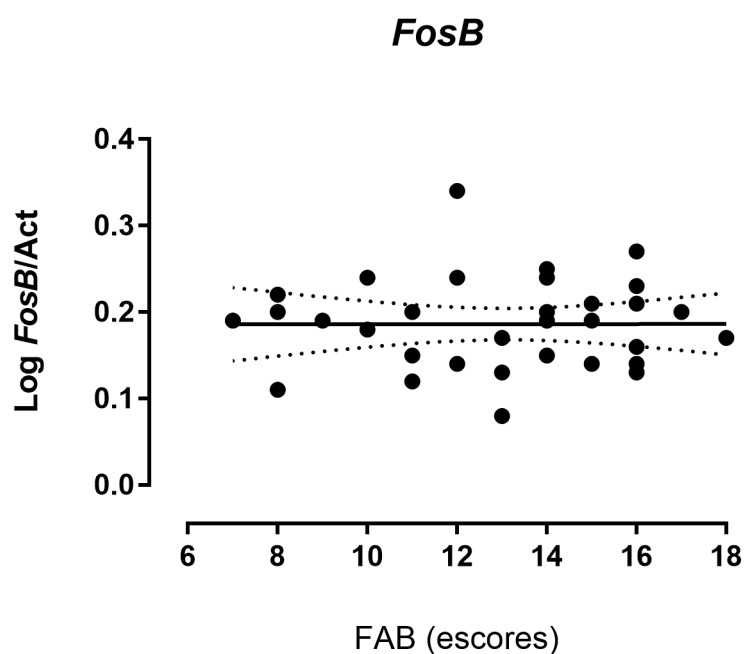
Apesar das médias do Log *FosB*/Act dos grupos CUA e AUD terem sido discretamente maiores quando comparadas ao grupo controle, a ANCOVA, tendo idade e uso de tabaco como covariáveis, não apresentou diferenças estatisticamente significantes [ $F(2,33) = 0,69$ ;  $p = 0,51$ ;  $R^2 = 0,047$ ] (Fig. 4). O tamanho de efeito  $g_s$  de Hedge para duas amostras independentes foi de 0,66 para o CUD (CONT =  $0,173 \pm 0,035$ ; CUD =  $0,196 \pm 0,056$ ) e de 0,30 para o grupo AUD (CONT =  $0,173 \pm 0,035$ ; AUD =  $0,185 \pm 0,052$ ) quando os Logs *FosB*/Act dos grupos CUD e AUD foram comparados aos controles separadamente.



**Figura 4:** Média dos valores de CT em Log para o gene *FosB* em pacientes usuários de crack (n=10), álcool (n=12) e controles (n=12).

#### 5.2.1 Associação da expressão do gene *FosB* com os testes cognitivos em todos sujeitos

Os escores da FAB ou do MMSE não se mostraram associados ao Log *FosB*/Act pela análise de regressão múltipla corrigida pela idade e escolaridade (Fig. 5).



**Figura 5:** Regressão linear da associação entre os escores do teste FAB e a expressão do gene *FosB*.

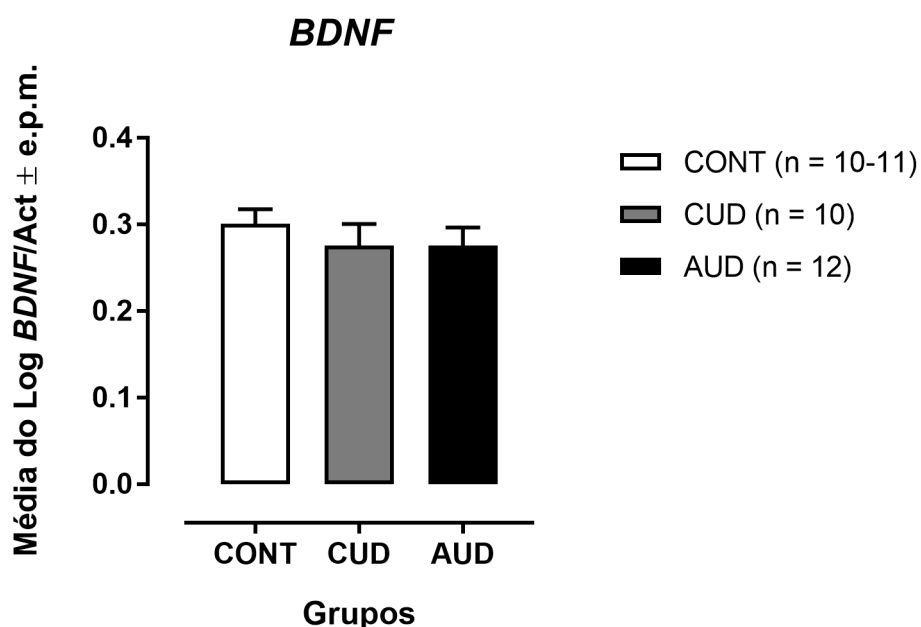
### 5.3 Análise da expressão relativa para o gene *BDNF* em pacientes usuários de crack, álcool e controles

A expressão de mRNA de *BDNF* no grupo CUD foi de 2,25 *fold-change* e no grupo AUD foi de 2,0 *fold-change*. Neste caso, como o valor do  $\Delta$ CT do grupo CONT foi maior do que os valores de  $\Delta$ CT dos grupos AUD e CUD, houve um aumento na expressão de *BDNF* em ambos grupos de pacientes AUD e CUD (Tab. 3).

Tabela 3 – Expressão de *BDNF* de indivíduos controles (CONT, n = 11), usuários de crack (CUD, n = 10) e alcoolistas (AUD, n = 12).

Expressão de <i>BDNF</i>		Grupos		
		CONT (n = 11)	CUD (n = 10)	AUD (n = 12)
<i>Fold change</i> e valores de CT				
Média CT	<i>Beta-Actina</i>	15,66	16,11	17,04
	<i>BDNF</i>	32,51	31,85	32,32
$\Delta$ CT		32,51-15,66 = 16,85	31,85-16,11 = 15,74	32,32-17,04 = 15,28
<i>Fold change</i>			2,25	2

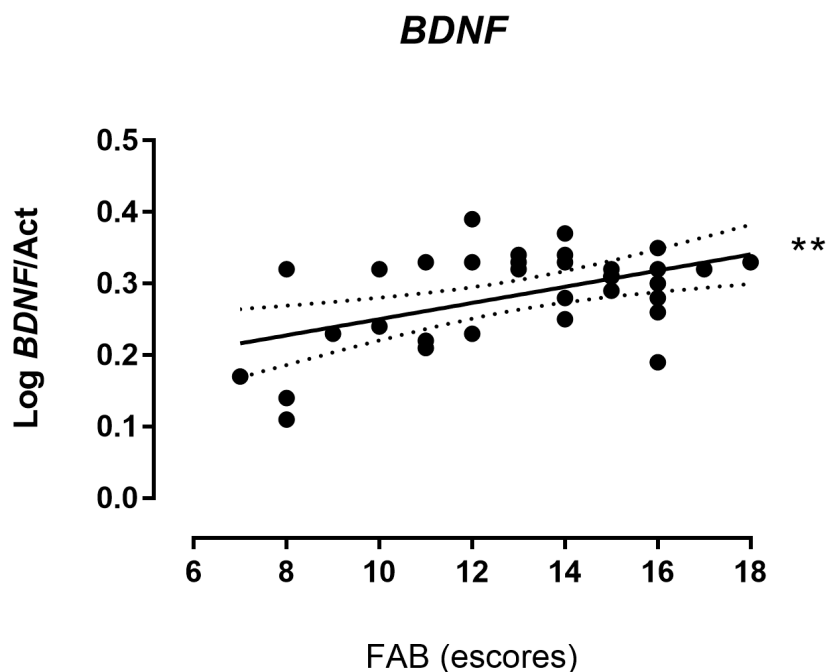
As médias do Log *BDNF/Act* dos grupos CUA e AUD foram menores comparados ao CONT. Entretanto a ANCOVA não encontrou uma diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos [ $F(2,32) = 0,78$ ;  $p = 0,47$ ;  $R^2 = 0,054$ ] (Fig. 6). O tamanho de efeito  $g_s$  de Hedge para duas amostras independentes foi de 0,36 para o CUD (CONT =  $0,298 \pm 0,051$ ; CUD =  $0,270 \pm 0,080$ ) e de 0,35 para o grupo AUD (CONT =  $0,298 \pm 0,051$ ; AUD =  $0,276 \pm 0,072$ ) quando os Logs *BDNF/Act* dos grupos CUD e AUD foram comparados aos controles separadamente.



**Figura 6:** Média dos valores de CT em Log para o gene *BDNF* em pacientes usuários de crack (n=10), álcool (n=12) e controles (n=10-11).

### 5.3.1 Associação da expressão do gene *BDNF* com testes cognitivos em todos sujeitos

Na análise de regressão múltipla tendo idade e escolaridade como covariáveis, sendo o Log *BDNF/Act* a variável dependente e os escores da FAB e MMSE as variáveis independentes incluindo todos os sujeitos deste estudo, os escores da FAB foram responsáveis por 17,6% da variância dos valores do Log *BDNF/Act*,  $F(2,32) = 3,276$ ;  $p = 0,035$ ,  $R^2$  ajustado = 0,176; IC 95% [0,002; 0,023]. A FAB apresentou correlação significativa de ordem zero ( $r = 0,499$ ,  $\beta = 0,56$ ) com o Log *BDNF/Act*, apresentando efeito parcial significante ( $p = 0,002$ ) no modelo completo (Fig. 7). Os escores do MMSE não se mostrou associado ao Log *BDNF/Act*.



**Figura 7:** Regressão linear da associação entre os escores do teste FAB e a expressão do gene *BDNF*. \*\* $p = 0,002$

#### 5.4 Análise da expressão relativa para o gene *DRD5* em pacientes usuários de crack, álcool e controles

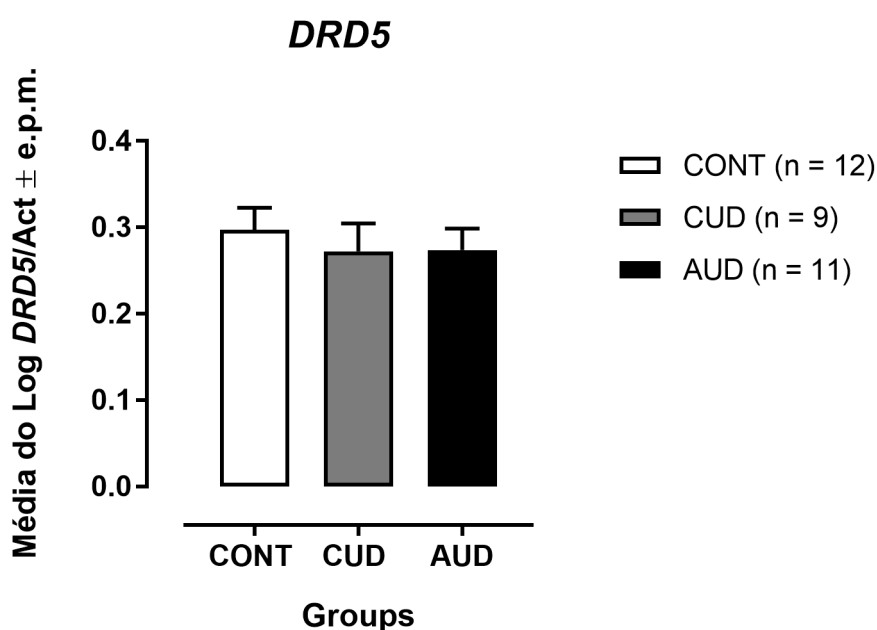
A expressão de mRNA de *DRD5* foi aumentada nos grupos AUD e CUD, com valor de *fold-change* de 2,22 em ambos grupos (Tab. 4).

Tabela 4 – Expressão de *DRD5* de indivíduos controles (CONT,  $n = 12$ ), usuários de crack (CUD,  $n = 9$ ) e alcoolistas (AUD,  $n = 11$ ).

Expressão de <i>DRD5</i>		Grupos		
		CONT ( $n = 12$ )	CUD ( $n = 10$ )	AUD ( $n = 11$ )
<i>Fold change</i> e valores de Ct				
Média CT	<i>Beta-Actina</i>	14,79	15,62	15,88
	<i>DRD5</i>	31,53	30,97	31,28
$\Delta$ CT		$31,53 - 14,79 =$ 16,74	$30,97 - 15,62 =$ 15,35	$31,28 - 15,88 =$ 15,4
Fold change			2,22	2,22



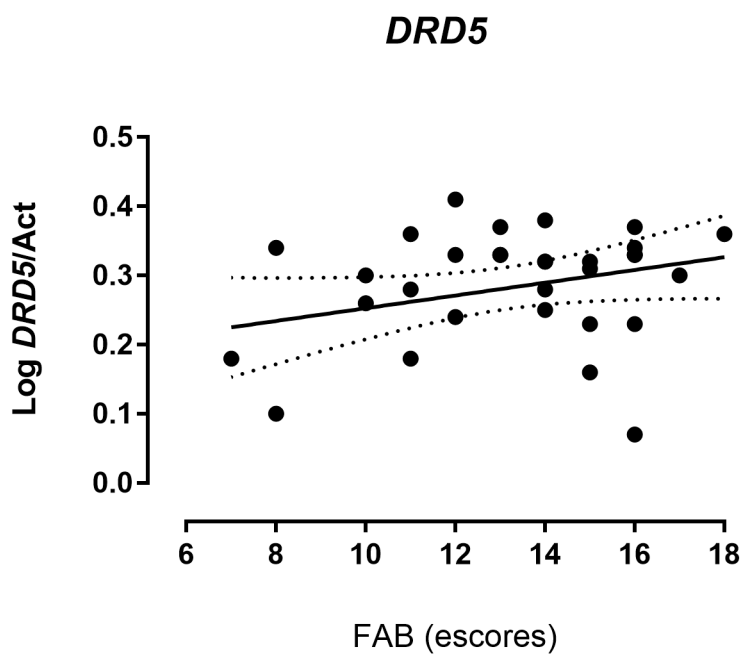
As médias do Log *DRD5*/Act dos grupos CUA e AUD discretamente menores comparado ao grupo controle, porém a ANCOVA, tendo idade e uso de tabaco como covariáveis, não encontrou diferenças estatisticamente significantes [ $F(2,31) = 0,77$ ;  $p = 0,47$ ;  $R^2 = 0,056$ ] (Fig. 8). O tamanho de efeito  $g_s$  de Hedge para duas amostras independentes foi de 0,26 para o CUD (CONT =  $0,297 \pm 0,089$ ; CUD =  $0,266 \pm 0,101$ ) e de 0,26 para o grupo AUD (CONT =  $0,297 \pm 0,089$ ; AUD =  $0,274 \pm 0,083$ ) quando os Logs *DRD5*/Act dos grupos CUD e AUD foram comparados aos controles separadamente.



**Figura 8:** Média dos valores de CT em Log para o gene *DRD5* em pacientes usuários de crack (n = 9) álcool (n = 11) e controles (n = 12).

#### 5.4.1 Associação da expressão do gene *DRD5* com testes cognitivos em todos sujeitos

Os escores da FAB ou do MMSE não se mostraram associados ao Log *DRD5*/Act pela análise de regressão múltipla corrigida pela idade e escolaridade (Fig. 9).



**Figura 9:** Regressão linear da associação entre os escores do teste FAB e a expressão do gene *DRD5*.

## **DISCUSSÃO**

---

## 6 Discussão

Os dados sociodemográficos dos sujeitos estudados (controles, usuários de crack e alcoolistas) estão em acordo com a literatura para cada um dos grupos analisados (BATISTA, et al., 2015; KLAUSS et al., 2014; KLAUSS et al., 2018; KLAUSS et al., 2018).

A média de idade dos grupos estudados variou de 42 a 48 anos, a maioria constituída por homens, exceto o grupos de alcoolistas, além disso, 50% ou mais dos dependentes eram tabagistas. Entretanto, não houveram diferenças nas comparações destas características entre os grupos. O desempenho executivo avaliado por um breve teste de rastreio foi equivalente entre os grupos e as pontuações encontradas são compatíveis com a escolaridade na população brasileira (BEATO et al., 2012). O desempenho cognitivo global avaliado pelo mini-exame do estado mental também foi equivalente entre os grupos com pontuações semelhantes às encontradas em populações mundiais (CRUM et al., 1993). Portanto, os indivíduos que compuseram os grupos deste estudo, mostraram-se razoavelmente pareados por idade, gênero, uso de tabaco e desempenhos executivo e cognitivo global.

Os indivíduos não foram pareados, entretanto, pela escolaridade, situação trabalhista e estado civil, sendo as diferenças encontradas relacionadas às consequências comportamentais e principalmente sociais, usualmente observadas nesta condição (TIFFANY et al., 2012). No entanto, os grupos de dependentes de crack-cocaína e de álcool deste estudo apresentaram bom nível de escolaridade (80-83% dos dependentes relataram acima de 10 anos de estudo), o que pode estar relacionado com o bom desempenho executivo e cognitivo global.

Assim, os resultados das análises moleculares e desempenho cognitivo aqui apresentados, provavelmente, não tiveram influência da idade, gênero, uso de tabaco e escolaridade. Entretanto, estas variáveis foram consideradas como covariáveis em análises nas quais o fator dependente analisado teria alguma influência da idade e do uso de tabaco, como no caso da expressão gênica de *FosB*,

*BDNF* e *DRD5*, e da idade e escolaridade, no caso dos desempenhos executivo (FAB) e cognitivo global (MMSE).

Com relação às análises moleculares feitas em sangue periférico, e os estudos das células mononucleares (linfócitos) presentes em sangue periférico tem sugerido que essas células funcionariam como “sonda” refletindo as mesmas mudanças moleculares que ocorrem no sistema nervoso central em doenças neuroinflamatórias e psiquiátricas, constituindo uma boa amostra biológica para análises moleculares *in vivo* que refletem o estado do indivíduo mais próximo da realidade (CENTOZONE; BATISTTINI; MACCARRONE, 2008; ROOFAZON et al., 2010; BUTTARELLI et al. 2011).

No entanto, não encontramos estudos na literatura que tenham realizado análises moleculares em sangue periférico, mais precisamente em linfócitos, em dependentes químicos. Com base nisso, nossos estudos tiveram como objetivo inicial a análise das possíveis alterações moleculares à nível de expressão gênica apresentadas em linfócitos de pacientes dependentes de crack e de álcool, comparados a indivíduos controles não-usuários de drogas. Foram analisadas as expressões gênicas do gene *FosB*, *BDNF* e *DRD5*.

Com relação ao gene *FosB*, o cálculo de fold-change sobre as diferenças de CTs do *FosB* e *Act* ( $\Delta$ CT) demonstrou uma redução de -1,15 no grupo CUD e de -2,17 no grupo AUD com relação do CONT, sugerindo ter ocorrido uma redução da expressão deste gene nos pacientes dependentes de crack-cocaína e de álcool.

É preciso ressaltar que na expressão gênica, maiores valores de CT refletem limiares de ciclo tardios, ou seja, o ciclo quantitativo no qual o mRNA do gene alvo é capturado, é tardio, significando que o número de cópias do cDNA é menor, consequentemente, há menor quantidade de mRNA na amostra pesquisada (SHIMITTGEN e LIVAK, 2008). Com base nisso, os valores maiores do Log *FosB/Act* observados nos grupos CUD e AUD refletem valores maiores de CT para captura do mRNA do *FosB*, e, por conseguinte, a menor expressão deste gene nestes grupos de pacientes.

Os valores  $g_s$  de Hedge de 0,66 para CUD e de 0,30 para AUD do Log *FosB/Act* indicam, *respectivamente*, tamanhos de efeito médio e pequeno de acordo com Cohen (1992) nas comparações com o grupo CONT sugerindo que embora não tenham sido encontradas diferenças significantes na comparação estatística entre os grupos, nos tamanhos dos efeitos sobre os controles pode ser considerado de relevância clínica. Interessantemente, em uma interpretação adicional os efeitos clínicos indicam que a chance de um indivíduo do grupo CUD apresentar Log *FosB/Act* maior que o de um indivíduo do grupo controle é de, aproximadamente, 64%, e de 50% para um indivíduo do grupo AUD.

Estudos anteriores em roedores indicaram que a exposição crônica a drogas modula as regiões de recompensa do cérebro através do aumento de uma isoforma da proteína FosB (delta-FosB) medida diretamente em circuitos de recompensa (VIALOU et al., 2012). No presente estudo foi observado que os níveis de expressão de mRNA de *FosB* foram reduzidos no sangue periférico de pacientes CUD e AUD. Essa redução na expressão de mRNA de *FosB* pode refletir a exposição à drogas à longo prazo, já que há evidências experimentais de que o grau de indução do gene *FosB* dessensibiliza parcialmente com a exposição repetida à anfetamina (ALIBHAI et al., 2007).

Além disso, Renthal et al. (2008) demonstraram que o acúmulo de delta-FosB após exposição crônica à anfetamina dessensibiliza a indução de mRNA de c-fos a repetidas exposições à drogas.

Um recente estudo *post-mortem* mostrou que a expressão das isoformas de FosB foi regulada negativamente no hipocampo de pacientes dependentes (Gajewski et al., 2016). Diferentemente, avaliamos a expressão do gene *FosB in vivo* em linfócitos.

A análise da expressão gênica de *BDNF* apresentou valores de *fold-change* de 2,25 para o grupo CUD e de 2,0 para o grupo AUD, *respectivamente*, revelando uma maior expressão desse gene nos pacientes dependentes de crack-cocaína e de álcool comparados aos controles não dependentes.

Neste caso, o oposto do que foi mencionado para o gene *FosB* deve ser considerado, ou seja, menores valores de CT, refletem limiares de ciclo menores, significando que o mRNA alvo presente na amostra analisada, possui maior quantidade de cópias. Com isso, os valores de Log *BDNF/Act* observados nos grupos CUD e AUD, apresentam valores menores de CT para a captura do gene *BDNF*, revelando a maior expressão deste gene nos grupos comparados ao CONT.

A maior expressão do gene *BDNF* corresponderam a tamanhos de efeito  $g_s$  de Hedge de 0,36 e 0,35 para os grupos CUD e AUD, respectivamente, na compração dos Logs *BDNF/Act* destes grupos comparados aos do grupo CONT, indicando um efeito de relevância clínica de pequena a média, de acordo com a convenção de Cohen (1992). Estes resultados evidenciam que, apesar de não haver diferença significativa na comparação dos Logs *BDNF/Act* entre os grupos, o aumento na expressão de mRNA de *BDNF* em pacientes com transtorno do uso de substâncias, é clinicamente relevante (SULLIVAN e FEINN, 2012). Adicionalmente, é possível sugerir que há uma chance de, aproximadamente, 60% para que um indivíduo do grupo CUD ou AUD apresente maior Log de *BDNF/Act* que um indivíduo controle.

Não encontramos na literatura estudos que avaliaram a expressão gênica de *BDNF* em usuários de crack e alcoolistas como realizamos aqui. Entretanto, um único estudo feito com pacientes dependentes químicos internados para tratamento, evidenciou que os níveis séricos da proteína *BDNF* no período de abstinência foi maior nos pacientes comparados aos controles (HUANG et al., 2011). Esses dados corroboram nossos achados de aumento da expressão de mRNA de *BDNF* em usuários de crack e álcool.

Em animais os estudos avaliando o envolvimento do *BDNF* com a dependência química, são mais evidentes. Grimm e colaboradores (2003) observaram um aumento na expressão da proteína *BDNF* nas estruturas mesolímbicas 90 dias após a retirada de auto-administração repetida de cocaína em ratos.

Outros pesquisadores mostraram que, em experimentos com ratos experientes em cocaína, a infusão de *BDNF* na AVT ou NAc restabeleceu a busca por cocaína após

um período de abstinência e levou a mudanças duradouras no sistema dopaminérgico mesolímbico (HORGES et al., 1999; MCCARTHY et al., 2012).

Com relação ao sistema dopaminérgico, no presente estudo investigamos a expressão do gene do receptor D5 da dopamina (DRD5) por ser este receptor um dos mais acessíveis no sangue periférico.

Os *fold-changes* calculados sobre o  $\Delta CT$  para o gene *DRD5* foram de 2,2 para ambos os grupos CUD e AUD com relação ao grupo CONT, sugerindo um aumento da expressão deste gene nos pacientes com transtorno do uso de substâncias. Semelhantemente aos resultados do gene *BDNF*, os valores de Log *DRD5/Act* nos grupos CUD e AUD foram menores que o CONT, refletindo a maior expressão do gene nestes grupos.

O tamanho do efeito considerando o Log *DRD5/Act* foi de 0,26, considerado pequeno segundo a convenção de Cohen, para ambos os grupos CUD e AUD quando comparados ao grupo CONT. De acordo com a interpretação alternativa deste dado, há uma chance de, aproximadamente, 57% para um indivíduo do grupo CUD ou AUD apresentar maiores valores de Log *DRD5* comparado a um indivíduo do grupo CONT.

O estudo de expressão gênica de receptores de dopamina em sangue periférico tem sido sugerido como um bom parâmetro que reflete as alterações na expressão de proteínas neuronais importantes em diversos circuitos cerebrais e que são condizentes com a situação psiquiátrica do indivíduo (BUTTARELLI et al., 2011).

Goodarzi e colaboradores (2009) avaliaram a expressão de mRNA do receptor de dopamina D5 em linfócitos de indivíduos dependentes à opiáceos em tratamento e abstinentes à longo prazo. Esses pesquisadores observaram uma redução significativa na expressão de mRNA de *DRD5* e associaram esses achados ao uso de metadona nesses pacientes, sugerindo um efeito normalizador do medicamento sobre a expressão gênica do receptor D5.



Semelhantemente, um estudo que analisou a expressão de mRNA dos receptores de dopamina (D1, D2, D5) em linfócitos de pacientes dependentes de jogos e encontrou valores reduzidos do mRNA *DRD5*.

Contrariamente, nossos dados mostram um discreto aumento na expressão de mRNA *DRD5* não significativo e com pequeno tamanho de efeito de acordo com o consenso de *Cohen* (1992). Tais resultados podem sugerir que as alterações nas vias dopaminérgicas mesolímbicas favorecidas pela elevação da expressão de BDNF após repetidas exposições à drogas (ANDERSON et al., 2017; MACCARTHY et al., 2012; MOST et al., 2014), podem induzir o aumento da expressão do receptor de dopamina D5.

Apesar da possível relação com a dependência (VOUSOOGHI et al., 2015; GOODARZI et al., 2009), a função cerebral desse receptor D5 de dopamina ainda não é bem esclarecida devido à falta de antagonistas específicos a eles (BUTTARELLI et al., 2011). Portanto, esses achados de expressão gênica do *DRD5* aqui apresentados, precisam ser melhor elucidados em investigações adicionais.

Embora este estudo não tenha ido além da etapa de transcrição de genes-alvos relacionados aos circuitos de recompensa cerebral e estado de dependência, outros trabalhos afirmam haver precisão e confiabilidade no uso de PCR em tempo real para estudos que visam correlacionar dados genéticos e distúrbios neurológicos (VOUSOOGHI et al., 2015; GOODARZI et al., 2009).

Interessantemente, dos três genes aqui estudados, apenas os dados de expressão gênica de BDNF apresentou associação com o desempenho executivo mensurado pela FAB, e nenhum deles se mostrou associado ao desempenho cognitivo global mensurado pelo MMSE, considerando todos os indivíduos envolvidos neste estudo (CONT, AUD, CUD), mostrando não haver diferença estatisticamente significativa na comparação do desempenho cognitivo entre os grupos.

No modelo de regressão linear aplicada no estudo, o desempenho da FAB foi preditora positiva do Log *BDNF/Act*, evidenciando que o menor desempenho da FAB

estaria relacionado a um valor maior do Log *BDNF/Act* e, portanto, menor expressão do gene *BDNF*.

Neste estudo observamos um aumento da expressão do gene *BDNF* nos pacientes com transtorno do uso de crack-cocaína e de álcool. Como houve uma associação significativa, mas aparentemente negativa, entre o desempenho executivo e a expressão do gene *BDNF*, a maior expressão deste gene na dependência química pode ser resultante de uma resposta compensatória à ação do crack-cocaína ou do álcool no sistema nervoso central. Por outro lado, entretanto, poderia ser desfavorável para as funções executivas como é usualmente observado nesta condição (ZAGO-GOMES e NAKAMURA-PALACIOS, 2009; GOLDSTEIN e VOLKOW, 2012).

Como o *BDNF* modula a plasticidade sináptica, o aumento da expressão desse gene após exposição à psicoestimulantes pode causar neuroadaptações que contribuem para o aumento da função dopaminérgica, aumento do comportamento de busca de drogas, *craving*, além de modular a aquisição de memória para os efeitos da droga (ROVARIS et al., 2017; MOST et al., 2014; MCCARTHY et al., 2012).

A associação entre o teste das funções executivas (FAB) e a expressão do gene *BDNF* observada neste estudo não encontra correlatos na literatura e sugere que o aumento da expressão de *BDNF* nas regiões cerebrais de projeções das vias dopaminérgicas (onde há maior liberação de *BDNF*), como no córtex pré-frontal (MCCARTHY et al., 2012), pode prejudicar as funções executivas mensuradas pelo FAB.

## **CONCLUSÃO**

---

## 7 Conclusão

- Os níveis de expressão dos genes-alvos envolvidos no estado de dependência química *FosB*, *BDNF* e *DRD5* estão alterados em indivíduos dependentes de crack-cocaína e de álcool, evidenciando a possibilidade de mensuração dos níveis de expressão gênica em linfócitos do sangue periférico.
- Foram encontrados níveis de expressão gênica reduzidos para o gene *FosB* tanto em pacientes alcoolistas quanto usuários de crack-cocaína.
- Os níveis de expressão do mRNA de *BDNF* e *DRD5* foram aumentados em pacientes alcoolistas e usuários de crack-cocaína.
- Houve associação significativa entre os escores do teste da função executiva FAB e o aumento do Log *BDNF/Act* correspondendo à redução da expressão do gene *BDNF*, sugerindo que a aplicação desse teste tem um potencial valor preditivo em relação à expressão gênica de *BDNF*.
- Essas evidências corroboram e comprovam que os linfócitos do sangue periférico constituem uma boa amostra biológica que reflete as alterações moleculares à nível de expressão gênica observadas no sistema nervoso central, especialmente no circuito de recompensa em pacientes com transtorno do uso de substâncias.

## **LIMITAÇÕES DO ESTUDO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## **8 Limitações do estudo e perspectivas futuras**

O estudo possui limitações nos valores de número amostral devido à rigidez dos critérios de inclusão para o estudo. Além disso, os pacientes internados no Hospital da Polícia Militar do Estado do Espírito Santo são passíveis de abandonar tanto o tratamento realizado internamente no hospital, quanto sua participação neste projeto de pesquisa, bem como se recusarem a doarem amostras de sangue.

Outra limitação deve-se ao fato de que nem todas as amostras de sangue coletada dos pacientes possuíram quantidades de RNA total suficientes para prosseguimento da síntese de cDNA.

Essas alterações moleculares compõem um quadro inicial e promissor que definem como estão os níveis de expressão gênica de moléculas importantes para o funcionamento da circuitaria de recompensa do sistema nervoso central na dependência química e se haveriam mudanças após tratamento.

Este estudo exclusivamente realizado em amostra biológica humana não encontra, até o momento, correlatos na literatura.

**REFERÊNCIAS**

---

## 9 Referências

ANDERSON, E.M.; WISSMAN, A.M.; CHEMPLANIKALA, J.; BUZINA, N.; GUZMAN, D.; LARSON, E.B.; NEVE, R.L.; NESTLER, E.J.; COWAN, C.W.; SELFA, D.W. BDNF-TrkB controls cocaine-induced dendritic spines in rodent nucleus accumbens dissociated from increases in addictive behaviors. **PNAS Early Edition**. 2017.

ALIBHAI, I. N.; GREEN, T. A.; POTASHKIN, J. A.; NESTLER, E. J. Regulation of fosB and (fosB mRNA expression: in vivo and in vitro studies. **Brain Res**. 1143, 22–33; 2007.

ANTON, R.F. Obsessive-compulsive aspects of craving: development of the Obsessive Compulsive Drinking Scale. **Addiction**. 95 Suppl 2:S211-217; 2000.

ANTON, R.F.; MOAK, D.H.; LATHAM, P. The Obsessive Compulsive Drinking Scale: a self-rated instrument for the quantification of thoughts about alcohol and drinking behavior. **Alcohol Clin Exp Res**. 19:92-99; 1995.

ANTON, R.F.; MOAK, D.H.; LATHAM, P.K. The obsessive compulsive drinking scale: A new method of assessing outcome in alcoholism treatment studies. **Arch Gen Psychiatry**. 53:225-231; 1996.

BERTOLUCCI, P.H.; BRUCKI, S.M.D.; CAMPACCI, S.R.C.; JULIANO, Y. O mini-exame do estado mental em uma população geral: impacto da escolaridade. **Arq NeuroPsiq**, 52:1-7. 1994.

BATISTA, E.K.; KLAUSS, J.; FREGNI, F., NITSCHKE, M.A.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. A Randomized Placebo-Controlled Trial of Targeted Prefrontal Cortex



Modulation with Bilateral tDCS in Patients with Crack-Cocaine Dependence. **Int J Neuropsychopharmacol.** 18(12); 2015.

BUTTARELLI, F.R.; FANCIULLI, A.; PELLICANO, C.; PONTIERI, F.E. The Dopaminergic System in Peripheral Blood Lymphocytes: From Physiology to Pharmacology and Potential Applications to Neuropsychiatric Disorders. **C Neuropharmacology**, 9, 278-288; 2011.

BATISTA, E.D.; KLAUSS, J.; FREGNI, F.; Michael A. NITSCHKE, M.A.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. A Randomized Placebo-Controlled Trial of Targeted Prefrontal Cortex Modulation with Bilateral tDCS in Patients with Crack-Cocaine Dependence. **Int J Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 12, p. pyv066, 2015.

BEATO, R.; AMARAL-CARVALHO, V.; GUIMARÃES, H.C.; TUMAS, V.; SOUZA, C.P.; OLIVEIRA, G.N.; CARAMELLI, P. Frontal assessment battery in a Brazilian sample of healthy controls: normative data. **Arq Neuro-Psiquiatr.** 70:4; 2012.

CIRILLO,G.; DI PINO, G.; CAPONE, F.; RANIERI,F.; FLORIO,L.; TODISCO,V.; TEDESCHI,G.; FUNKE, K.; DI LAZZARO, V. Neurobiological after-effects of non-invasive brain stimulation. **Brain Stimul.** 10(1):1-18; 2017.

CUNHA, P.J.; NOVAES, M.A. Avaliação neurocognitiva no abuso e dependência do álcool: implicação no tratamento. **Rev Bras Psiq.** 26(1): S23-7, 2004.

CENTONZE, D.; BATTISTINI, L.; MACCARRONE, M. The Endocannabinoid System in Peripheral Lymphocytes as a Mirror of Neuroinflammatory Diseases. **C Pharm Design.** 14, 2370-2382; 2008.

COHEN, J. A power primer. **Psychol. Bull.** 112, 155–159; 1992.

CRUM, R.M; ANTHONY, J.C; BASSETT, S.S; FOLSTEIN, M.F. Population-based norms for the Mini-Mental State Examination by age and educational level. **JAMA.** 269:2386-2391; 1993.

DE WILDT W.A; LEHERT, P.; SCHIPPERS G.M.; NAKOVICS, H.; MANN, K.; VAN DEN BRINK, W. Investigating the structure of craving using structural equation modeling in analysis of the obsessive-compulsive drinking scale: a multinational study. **Alcohol Clin Exp Res.** 29:509-516; 2005.

FISCHER, B.; BLANKEN, P.; DA SILVEIRA, D.; GALLASSI, A.; GOLDNER, E.M.; REHM, J. et al. Effectiveness of secondary prevention and treatment interventions for crack-cocaine abuse: A comprehensive narrative overview of English-language studies. **Int J Drug Policy.** ;26(4):352-63; 2015.

GEORGE, O.; KOOB G. F. Control of craving by the prefrontal cortex. **PNAS.** vol. 110, no. 11, 4165–416; 2013.

GAJEWSKI, P.A.; TURECKI, G.; ROBISON, A.J. Differential Expression of FosB Proteins and Potential Target Genes in Select Brain Regions of Addiction and Depression Patients. **PLoS One.** 11(8):e0160355; 2016.

GRIMM, J. W., LU, L., HAYASHI, T., HOPE, B. T., SU, T. P., SHAHAM, Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. **J. Neurosci.** 23, 742–747; 2003.

GOODARZI A., VOUSOOGHI N., SEDAGHATI M., MOKRI A., ZARRINDAST M.R. Dopamine receptors in human peripheral blood lymphocytes: changes in mRNA expression in opioid addiction. **Eur J Pharmacol.** 615:218–222; 2009.

GOLDSTEIN, R. Z.; VOLKOW, N. D. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. **Nature Rev Neurosci.** 12: 653-669; 2012.

HAMILTON, M. The assessment of anxiety states by rating. **Br J Med Psychol.** 32:50-55; 1959.

HAMILTON, M. A rating scale for depression. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 23:56-62; 1960.

HORMES, J.M.; COFFEY, S.F.; DROBES, D.J.; SALADIN, M.E. The Obsessive Compulsive Cocaine Use Scale: development and initial validation of a self-rated instrument for the quantification of thoughts about cocaine use. **Drug Alcohol Depend.** 120(1-3):250-4; 2012.

HUANG, M.; CHEN, C.; LIU, H.; CHEN, C.; HO, C.; LEU, S. Differential Patterns of Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alcoholic Patients With and Without Delirium Tremens During Acute Withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res.** 35(N1) 126-131; 2011.

HORGER, B.A.; IYASERE, C.A.; BERHOW, M.T.; MESSER, C.J.; NESTLER, E.J.; TAYLOR, J.R. Enhancement of Locomotor Activity and Conditioned Reward to Cocaine by Brain-Derived Neurotrophic Factor. **J of Neurosci.** 19(10):4110–4122; 1999.

KLAUSS, J.; PENIDO PINHEIRO, L.C.; SILVA MERLO, B.L.; CORREIA SANTOS, G.D.E.; FREGNI, F.; NITSCHKE, M.A.; et al. A randomized controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with tDCS in patients with alcohol dependence. **Int J Neuropsychopharmacol.** 17(11):1793-803; 2014.

KLAUSS, J.; ANDERS, Q.S.; FELIPPE, L.V.; NITSCHKE, M.A.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. Multiple Sessions of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Reduced Craving and Relapses for Alcohol Use: A Randomized Placebo-Controlled Trial in Alcohol Use Disorder. **Fron in Pharmacology.** Vol 9:716; 2018.

KLAUSS, J.; ANDERS, Q.S.; FELIPPE, L.V.; FERREIRA, L.V.B.; CRUZ, M.A.; NITSCHKE, M.A.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. Lack of Effects of Extended Sessions of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) Over Dorsolateral Prefrontal Cortex on Craving and Relapses in Crack-Cocaine Users. **Fron in Pharmacology.** Vol 9:1198; 2018.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Front. Psychol.** 4:863; 2013.

MOST, D.; WORKMAN, E.; HARRIS, R.A.; Synaptic adaptations by alcohol and drugs of abuse: changes in microRNA expression and mRNA regulation. **Fron in Mol Neuros.** Vol 7 (85) 1-11; 2014.

MCCARTHY, D.M.; BROWN, A.N.; BHIDE, P.G. Regulation of BdnF Expression by cocaine. **Yale J of Bio and Med.** 85:437-446; 2012.

NESTLER, E.J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 363(1507):3245-55; 2008.

NESTLER, E.J. Transcriptional mechanisms of drug addiction. **Clin Psychopharmacol Neurosci**. 10(3):136-43; 2012.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocol**. Vol 1:3; 1559-1582; 2006.

ROOZAFZON, R.; GOODARZI, A.; VOUSOOGHI, N.; SEDAGHATI, M.; YAGHMAEI, P.; MOHAMMAD-REZA, Z. Expression of NMDA receptor subunits in human peripheral blood lymphocytes in opioid addiction. **J Pharmacology**. 638, 29–32; 2010.

ROBISON, A.J.; NESTLER, E.J.; Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. **Nat Rev Neurosci**. 12(11):623-37; 2011.

ROVARIS, D.L.; SCHUCH, J.B.; GRASSI-OLIVEIRA, R; SANVICENTE-VIEIRA, B.; SILVA, B.S.; WALSS-BASS, C.; MÜLLER, D.; STOLF, A.R.; VON DIEMEN, L.; CERESE\_R, K.M.M.; PIANCA, T.G.; SZOBOT, C.M.; KESSLER, F.H.P.; ROMAN, T.; BAU, C.H.D.; Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. **J of Psychiatric**. 90 (78-85); 2017.

SANCHIS-SEGURA, C.; SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addict Biol**. 11(1):2-38; 2006.

SIEGAL, H.A.; LI, L.; RAPP, R.C. Abstinence trajectories among treated crack cocaine users. **Addict Behav**. 27(3):437-49; 2002.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. **Nature Protocols**. VOL.3, NO.6, 1101-1108; 2008.

SULLIVAN, G.M.; FEINN, R. Using Effect Size – or Why the *P* value is Not Enough. Editorial. **J of Grad Med Education**. 279-282; 2012.

SULLIVAN, P.F.; NEALE, M.C.; SILVERMAN, M.A.; HARRIS-KERR, C.; MYAKISHEV, M.V.; WORMLEY, B.; WEBB, B.T.; MA, Y.; KENDLER, K.S.; STRAUB, R.E. An association study of DRD5 with smoking initiation and progression to nicotine dependence. **Am J Med Genet**. 105:259–265; 2001.

TIFFANY, S.T.; FRIEDMAN, L.; GREENFIELD, S.F.; HASIN, D.S.; JACKSON, R. Beyond drug use: a systematic consideration of other out- comes in evaluations of treatments for substance use disorders. **Addiction**. 107:709–718; 2012.

UNODOC-WHO. International Standards for the Treatment of Drug Use Disorders. 2016.

VOLKOW, N.D.; WANG, G.J.; FOWLER, J.S.; TOMASI, D. Addiction circuitry in the human brain. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 52:321-36; 2012.

VOUSOOGHI, N.; ZAREI, S.Z.; SADAT-SHIRAZI, M.S.; EGHBALI, F.; ZARRINDAST, M.R. mRNA expression of dopamine receptors in peripheral blood lymphocytes of computer game addicts. **J Neural Transm**. 122(10):1391-8; 2015.

VIALOU, V.; FENG, J.; ROBISON, A. J.; KU, S.M.; FERGUSON, D.; SCOBIE, K.; MAZEI-ROBISON, M.; MOUZON, E.; NESTLER, E.J. Serum response factor and cAMP response element binding protein are both required for cocaine induction of  $\Delta$ FosB. **J Neurosci.** 32(22): 7577–7584; 2012.

VORSPAN, F.; BELLAIS, L.; ROMO, L.; BLOCH, V.; NEIRA, R.; LEPINE, J.P. The Obsessive-Compulsive Cocaine Scale (OCCS): a pilot study of a new questionnaire for assessing cocaine craving. **Am J Addict.** 21:313-319; 2012.

YAMADA, S.; KATO, S.; MATSUHISA, T.; MAKONKAWKEYOON, L.; YOSHIDA, M.; CHAKRABANDHU, T.; LERTPRASERTSUK, N.; SUTTHARAT, P.; CHAKRABANDHU, B.; NISHIUMI, S.; CHONGRAKSUT, W.; AZUMA, T. Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA Thais is risk for gastric cancer. **World J Gastroenterol.** 19(19): 2941-2949; 2013.

ZAGO-GOMES, M.P.; NAKAMURA-PALACIOS, E.M. Cognitive Components of Frontal Lobe Function in Alcoholics Classified According to Lesch's Typology. **Alcohol and Alcoholism.** 44(5): 449-457; 2009.

**ANEXOS**

---



## Anexo I – Artigo



# FosB mRNA Expression in Peripheral Blood Lymphocytes in Drug Addicted Patients

Quézia Silva Anders<sup>1</sup>, Jaisa Klaus<sup>1</sup>, Livia Carla de Melo Rodrigues<sup>2</sup> and Ester Miyuki Nakamura-Palacios<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cognitive Sciences and Neuropsychopharmacology, Program of Post-Graduation in Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil, <sup>2</sup> Laboratory of Neurotoxicology and Psychopharmacology, Program of Post-Graduation in Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

## OPEN ACCESS

## Edited by:

Juan J. Canales,  
University of Tasmania, Australia

## Reviewed by:

Fabio Cardoso Cruz,  
Federal University of São Paulo, Brazil  
Marcos Tadeu Marín,  
Universidade Estadual Paulista Júlio  
de Mesquita Filho (UNESP), Brazil

## \*Correspondence:

Ester Miyuki Nakamura-Palacios  
emnpalacios@gmail.com

## Specialty section:

This article was submitted to  
Neuropharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

Received: 29 June 2018

Accepted: 02 October 2018

Published: 24 October 2018

## Citation:

Anders QS, Klaus J,  
Rodrigues LCM and  
Nakamura-Palacios EM (2018) FosB  
mRNA Expression in Peripheral Blood  
Lymphocytes in Drug Addicted  
Patients. *Front. Pharmacol.* 9:1205.  
doi: 10.3389/fphar.2018.01205

*FosB* gene heterodimerizes with Jun family proteins to form activator protein 1 (AP-1) complexes that bind to AP-1 sites in responsive genes to regulate transcription in all cells. The genic expression of *FosB* seems to be modified after long time exposure to drugs of abuse and these changes may be involved in craving and addicted behavior. This study investigated the *FosB* mRNA expression in peripheral blood lymphocytes of drug addicted patients using real-time PCR approach. Thus, patients with crack-cocaine use disorder (CUD,  $n = 10$ ), alcohol use disorder (AUD,  $n = 12$ ), and healthy non-addicted subjects (CONT,  $n = 12$ ) were assessed. *FosB* mRNA expression was reduced by 1.15-fold in CUD and 2.17-fold in AUD when compared to CONT. Hedge's effect size  $g_s$  over log *FosB*/Act was of 0.66 for CUD and of 0.30 for AUD when compared to controls. This study showed that *FosB* mRNA expression was detected in lymphocytes from peripheral blood for the first time, and it was less expressed in drug addicted patients. This molecular technique may constitute a potential peripheral marker for substance use disorder.

**Keywords:** *FosB*, mRNA expression, lymphocyte, crack-cocaine use disorder, alcohol use disorder

## INTRODUCTION

The use of addictive drugs has been associated with alteration of gene expression in the brain that result in long-term changes on synapses and neural circuits and consequent neuroadaptive and behavioral changes such as tolerance and craving, which may underlie the development and maintenance of drug addiction (Nestler, 2008; Gajewski et al., 2016).

*FosB* gene heterodimerizes with Jun family proteins to form activator protein 1 (AP-1) complexes that bind to AP-1 sites in responsive genes to regulate transcription in all cells. There is evidence that the *FosB* genic expression can be modified after long-term drug exposure, increasing craving and aggravating the addictive behavior (Nestler, 2008; Gajewski et al., 2016).

According to Nestler (2012), drugs of abuse activates excitatory synapses increasing  $Ca^{2+}$  channels permeability into the neuron, triggering intracellular targets to induce up or down regulation of genic expression. These alteration of genic expression in target genes like *CREB*, *BDNF*, and *FosB* would be involved in the development of a "state of addiction" (Nestler, 2013).

A truncated product of the *FosB* gene, the delta-*FosB*, gradually accumulates through a course of repeated exposure to virtually all drugs of abuse and because of its unusual stability, its levels persist for weeks after drug cessation, mediating the sensitized responses to drug exposure (Nestler, 2008, 2013).

## RESULTS

We used RT-PCR to measure mRNA expression levels in human PBLs of CUD and AUD patients in comparison with non-addicted controls.

These groups were well-paired by age and gender, but other socio-demographic characteristics was unequal (Table 1). Schooling was found different among groups ( $p < 0.05$ ) possibly because of higher proportion of middle school degree in AUD patients when compared to higher school degree in control and CUD patients; employment situation was different among groups ( $p = 0.001$ ) as larger proportion of CUD and AUD patients was unemployed and/or working as freelancers and smaller proportion of them was formally employed; and marital state was also different among groups ( $p < 0.01$ ) as higher proportion was married or living in common law in control and AUD groups, whereas CUD patients were mostly single or widow (Table 1). These differences could be expected to be seen in crack-cocaine and alcohol addicted population due to important behavioral and social consequences of these substance use disorders.

Alcohol use disorder and CUD patients used high amount of alcohol drinks and rocks of crack-cocaine per day, respectively (Table 1). More than half of them were tobacco users but not significantly different from control group. No between group differences were found regarding cognitive performance (FAB and MMSE) (Table 1, see Supplementary Material for clinical measurements description). Symptoms of depression in the HAM-D scored into normal range and of anxiety (HAM-A) indicated mild symptoms in both AUD and CUD patients. Craving scores (5-items of OCDS or OCCS) were mild to moderate in both substance use disorder. Mean scores of these clinical measurements are similar to those found in our previous studies in these specific substance use disorders (Klauss et al., 2014; Batista et al., 2015).

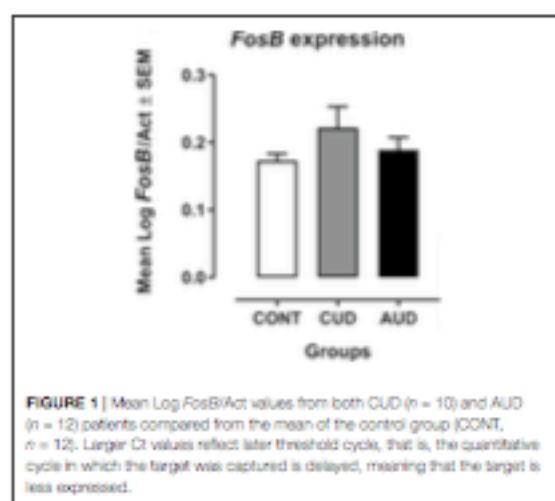
Mean Log FosB/Act values from both CUD and AUD patients were slightly larger from the mean found in the control group (Figure 1). However, no statistically significant difference was found in the ANCOVA having age as covariate [ $F(2,30) = 1.002$ ,  $p = 0.379$ ,  $\eta^2 = 0.063$ ]. But, Hedge's effect size  $g_s$  was of 0.66 for CUD and of 0.30 for AUD when Log FosB/Act was individually compared to controls.

It must be noted that in gene expression, larger Ct values reflect later threshold cycle, that is, the quantitative cycle in which the target was captured is delayed, meaning that the target is less expressed (Schmittgen and Livak, 2008).

In fact, when considering the fold-change analysis, the FosB mRNA was less expressed by 1.15-fold in the CUD patient and by 2.17-fold in the AUD patients when normalized to controls (Table 1).

## DISCUSSION

According to "peripheral marker hypothesis," changes in genetics expression in the brain are reflected in peripheral blood lymphocytes (Roozafzoon et al., 2010). Basing on this theory, our study may constitute the first to demonstrate the FosB mRNA



**FIGURE 1 |** Mean Log FosB/Act values from both CUD ( $n = 10$ ) and AUD ( $n = 12$ ) patients compared from the mean of the control group (CONT,  $n = 12$ ). Larger Ct values reflect later threshold cycle, that is, the quantitative cycle in which the target was captured is delayed, meaning that the target is less expressed.

expression in lymphocytes from peripheral blood, and to show that it is possibly altered in drug addicted patients.

Hedge's  $g_s$  of 0.66 for CUD and of 0.30 for AUD indicate, respectively, medium and small effect sizes according to Cohen (1992) in between-groups comparisons, suggesting that although no significant differences were found in the statistical analysis, effects sizes over controls could be meaningful.

Previous studies in rodents indicated that chronic exposure to drugs modulates brain reward regions through the increased of a FosB isoform (delta-FosB) directly measured in reward circuits (Vialou et al., 2012). We found that expression levels of FosB mRNA was decreased in peripheral blood of CUD and AUD patients. This reduced FosB mRNA expression may reflect the long-term exposition to the drugs as there is experimental evidence that the degree of FosB gene induction partially desensitizes with repeated exposure to amphetamine (Alibhai et al., 2007). Besides, Renthal et al. (2008) demonstrated that accumulation of delta-FosB after chronic amphetamine exposure desensitizes c-fos mRNA induction to a subsequent drug dose.

A recent post-mortem study showed that the expression of FosB isoforms was downregulated in the hippocampus of addicted patients (Gajewski et al., 2016). Differently, we are here measuring in vivo FosB gene expression in PBLs.

Levels of FosB mRNA expression in PBLs may represent a peripheral marker for molecular changes in substance use disorders and could be useful to follow the after effects of drug dependence treatment, especially those that potentially modify synaptic plasticity such as non-invasive brain stimulation (Cirillo et al., 2017), which has shown to decrease craving and relapses to the drug use (Klauss et al., 2014; Batista et al., 2015). This possibility needs to be carefully investigated.

There are limitations that must be considered. The high complexity and cost of the method with limited budget, and the restricted inclusion and exclusion criteria, have limited the number of subjects included in our samples. We have collected 36 samples from non-addicted controls, 27 from AUD and 17



from CUD patients, but included in the analysis only technically adequate samples. Here we explored the expression of only one gene, but other gene expressions such as of *BDNF* and dopamine receptors are under collection or processing and will be published in the near future.

Patients included in this study were recruited from our major clinical trial registered in ClinicalTrials.gov<sup>1,2</sup>

In summary, *FosB* mRNA expression was detected in lymphocytes from peripheral blood and showed to be mildly reduced in drug addicted patients. Thus, with a great caution because these are preliminary data, it may be suggested that this molecular technique could constitute a potential peripheral marker to measure changes in substance use disorders.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors have read and approved the manuscript for submission; have made a substantial contribution to the

conception, design, gathering, analysis and/or interpretation of data and a contribution to the writing and intellectual content of the article; and acknowledge that they have exercised due care in ensuring the integrity of the work.

## FUNDING

EN-P was recipient of a researcher fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (proc. 304374/2014-8) and was also funded by this agency (proc. 466650/2014-0). JK and QA were recipient of graduate student fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.01205/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Alibhai, I. N., Green, T. A., Potashkin, J. A., and Nestler, E. J. (2007). Regulation of *FosB* and *FosB* mRNA expression: in vivo and in vitro studies. *Brain Res.* 1143, 22–33. doi: 10.1016/j.brainres.2007.01.069
- Batista, E. K., Klaus, J., Fregni, P., Nitsche, M. A., and Nakamura-Palacios, E. M. (2015). A Randomized placebo-controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with bilateral tDCS in patients with crack-cocaine dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18, 1–11. doi: 10.1093/ijnp/nyv066
- Cirillo, G., Di Pino, G., Capone, F., Ranieri, F., Florio, L., Todisco, V., et al. (2017). Neurobiological after-effects of non-invasive brain stimulation. *Brain Stimul.* 10, 1–18. doi: 10.1016/j.brs.2016.11.009
- Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychol. Bull.* 112, 155–159. doi: 10.1037/0033-2909.112.1.155
- Gajewski, P. A., Turecki, G., and Robison, A. J. (2016). Differential expression of *FosB* proteins and potential target genes in select brain regions of addiction and depression patients. *PLoS One* 11:e016355. doi: 10.1371/journal.pone.0160355
- Klaus, J., Penido Pinheiro, L. C., Silva Mendes, B. L., Correia Santos, G. D. E., Fregni, P., Nitsche, M. A., et al. (2014). A randomized controlled trial of targeted prefrontal cortex modulation with tDCS in patients with alcohol dependence. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 1793–1803. doi: 10.1017/S1461145714000984
- Lakens, D. (2015). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front. Psychol.* 4:863. doi: 10.3389/fpsyg.2015.00863
- Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 363, 3245–3255. doi: 10.1098/rstb.2008.0067
- Nestler, E. J. (2012). Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 10, 136–143. doi: 10.9758/cpn.2012.10.3.136
- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory addiction. *Dialogues Clin. Neurosci.* 14, 441–443.
- Renthal, W., Carle, T. L., Maze, L., Covington, H. E. III, Treong, H.-T., Alibhai, I., et al. (2008). *FosB* mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *J. Neurosci.* 28, 7344–7349. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1043-08.2008
- Robison, A. J., and Nestler, E. J. (2012). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637. doi: 10.1038/nrn3111
- Roozafzoon, R., Goodarzi, A., Vossoughi, N., Sedaghati, M., Yaghmaei, P., and Mohammad-Reza, Z. (2010). Expression of NMDA receptor subunits in human peripheral blood lymphocytes in opioid addiction. *J. Pharmacol.* 638, 29–32. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.04.017
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73
- Vialou, V., Feng, J., Robison, A. J., Ku, S. M., Ferguson, D., Scobie, K., et al. (2012). Serum response factor and cAMP response element binding protein are both required for cocaine induction of  $\Delta$ FosB. *J. Neurosci.* 32, 7577–7584. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1381-12.2012
- Yanada, S., Kato, S., Matsubara, T., Makonkawkeyoon, L., Yoshida, M., Chakraborty, T., et al. (2013). Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA *Helicobacter* is risk for gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2941–2949. doi: 10.3748/wjg.v19.i19.2941

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Anders, Klaus, Rodrigues and Nakamura-Palacios. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Anexo II – DSM IV

Um padrão mal adaptativo de uso de substância, levando a prejuízos clinicamente significantes ou ao desconforto (“distress”), manifestado por três ou (mais) dos seguintes itens, ocorrendo em um período de 12 meses.

1. Tolerância, definido por: a) uma necessidade de quantidades marcadamente aumentadas da substância para atingir intoxicação ou o efeito desejado; b) efeito marcadamente diminuído com o uso continuado da mesma quantidade da substância.	
2. Abstinência, manifestada pelos seguintes sintomas: a) síndrome de abstinência característica para a substância (critérios A e B específicos estabelecidos para a substância). b) a mesma substância (ou uma muito próxima) é tomada para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.	
3. A substância é freqüentemente ingerida em quantidades maiores ou em um período maior que o pretendido.	
4. Há um desejo persistente ou esforços sem sucesso para interromper ou controlar o uso da substância.	
5. Um tempo muito grande é gasto em atividades necessárias para se obter a substância (p.ex., visitas a múltiplos médicos, ou dirigir longas distâncias), para o uso da substância (p.ex., corrente de fumo), ou para se recuperar de seus efeitos.	
6. Atividades sociais, ocupacionais, ou recreacionais importantes são desistidas ou reduzidas por causa da substância.	
7. O uso da substância é continuada a despeito do conhecimento de haver problemas físicos ou psicológico persistentes ou recorrente que parecem ter sido causados ou exacerbados pela substância (p.ex., uso da cocaína apesar de reconhecer a depressão induzida pela droga, ou uso continuado do beber apesar de reconhecer que uma úlcera pode ser piorada pelo consumo do álcool).	
Especificar se: com dependência fisiológica: evidência de tolerância ou abstinência (i.e., ambos os itens 1 e 2 estão presentes).	
Sem dependência fisiológica: nenhuma evidência de tolerância ou abstinência (i.e., nenhum dos itens 1 e 2 estão presentes)	

## Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles)

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária no estudo denominado **“Testes Cognitivos Frontais, Potenciais Relacionados a Eventos sob a apresentação de estímulos visuais, Estudos de Neuroimagem e da Expressão Gênica em jovens e adultos saudáveis”**.

#### Objetivo do estudo

Neste estudo pretende-se validar os testes cognitivos, a avaliação eletrofisiológica com *old ball* visual e exames de neuroimagem sem contraste e em repouso, e análises moleculares da expressão gênica de fatores de transcrição, neurotrofina e receptores de neurotransmissores em voluntários saudáveis para servirem de parâmetros de comparação para pacientes alcoolistas, usuários de crack e adultos portadores do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

#### Procedimentos

Em sua visita ao laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas será feito um exame de registro de sua função cerebral enquanto você estiver vendo algumas imagens relacionadas ou não ao uso de bebida alcoólica ou ao uso de crack, e no mesmo momento sua atividade elétrica cerebral será sendo avaliada. A atividade elétrica será medida por meio de 32 eletrodos distribuídos em sua cabeça, e estas informações serão passadas para um computador. Você irá realizar alguns testes cognitivos em um computador e será solicitado a responder apertando um ou mais botões de um joystick, no intuito de avaliar o número de acertos e a velocidade resposta frente a um estímulo visual. Em seguida, você será encaminhado para o serviço de Radiologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) onde será feito um exame de ressonância magnética em sua cabeça sem uso de contraste e em repouso durante aproximadamente 20 minutos. Serão coletados 5 ml de sangue periférico que, após a coleta, serão processados para extração do RNA total presente em linfócitos no prazo máximo de 3 h. Esse material genético será imediatamente congelado em freezer -80°C para armazenamento até o início dos experimentos posteriores de síntese de cDNA e PCR-RT. As amostras de RNA total serão armazenadas no Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES sob a responsabilidade da doutoranda Quêzia Anders. Os voluntários ao assinarem o TCLE, tomarão conhecimento das análises moleculares que serão feitas e podem ter acesso aos resultados assim que estiverem prontos, bem como receberão toda orientação genética adequada e correspondente aos resultados obtidos nessa pesquisa e em possíveis pesquisas futuras. A qualquer momento, os participantes poderão solicitar a descontinuação de sua participação da pesquisa, declarando por escrito que suas amostras não poderão ser utilizadas e serão descartadas em descarte próprio para amostras biológicas, conforme regulamento da Anvisa.

O responsável por este estudo é: Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios, CRM 4746/ES.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre ética em pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – situado no Centro de Ciências da Saúde da UFES.

Todas as informações obtidas relativas a sua participação neste estudo serão analisadas, desta forma, a confidencialidade da sua participação.

**Desta forma, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Testes Cognitivos Frontais, Potenciais Relacionados a Eventos sob a apresentação de estímulos visuais e Estudos de Neuroimagem em jovens e adultos saudáveis”.**

Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/representante legal

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para participação neste estudo.

---

***Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios CRM/ES 4746***

**Médica responsável pelo estudo**

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Obs.:** Caso não seja possível contatar os médicos responsáveis pelo estudo, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo pelo telefone 3335-7211 ou pelo e-mail: [cep.ufes@hotmail.com](mailto:cep.ufes@hotmail.com)

## **Anexo IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes)**

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária no estudo denominado **"Tratamento do Alcoolismo pela Neuromodulação Cognitiva Produzida pela Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua Repetida sobre o Córtex Pré-Frontal Dorsolateral Esquerdo."**

#### **Objetivo do estudo**

Este estudo é para avaliar o tratamento de alcoolismo através da estimulação transcraniana de corrente contínua de baixa intensidade e verificar se ocorre mudanças nas funções frontais e de registro de potencial relacionado a eventos. Será realizado em alcoolistas atendidos no Programa de Atendimento ao Alcoolista do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (PAA/HUCAM/CCS/UFES) e Centro de Atenção Psicossocial de Álcool e outras Drogas (CAPES-AD de Laranjeiras) classificados clinicamente em diferentes tipos de alcoolismo de acordo com a Tipologia de Lesch.

#### **Procedimentos**

Na sua consulta com o médico do Programa de Atendimento ao Alcoolista do Hospital das Clínicas da UFES você será avaliado e informado sobre o estudo.

Você não é obrigado a participar do estudo.

O seu atendimento no ambulatório será igual aos dos outros pacientes.

Se você aceitar participar, você será encaminhado para o laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas onde fará um teste para avaliar a sua inteligência (função mental), capacidade de realizar tarefas (funções executivas) e memória. A seguir, será feito um exame de registro de sua função cerebral enquanto você estiver vendo algumas imagens relacionadas ou não ao uso de bebida alcoólica.

Você será submetido a cinco sessões de estimulação elétrica de baixa intensidade (uma por dia por cinco dias consecutivos) na parte anterior de sua cabeça, ou uma simulação desta estimulação, sendo que você irá sentir uma sensação de coceira nos 5 segundos iniciais e mais nada, não sentirá dor ou desconforto. A sessão de aplicação da estimulação elétrica de baixa intensidade dura cerca de 46 minutos (13 minutos de estimulação seguida de 20 minutos de descanso e mais 13 minutos de estimulação) é de baixo risco. Em raros casos, pode produzir uma leve tontura. Feridas leves na pele no local da aplicação do estímulo são descritas apenas em aplicações repetidas (acima de 5 aplicações), o que não será o caso neste estudo. A aplicação desta estimulação cerebral não-invasiva poderá melhorar a sua capacidade de memória e também inibir a sua vontade de beber bebida alcoólica, podendo favorecer o seu tratamento da dependência ao álcool.

Os responsáveis por este estudo são: Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios, CRM 4746/ES, Dra. Maria da Penha Zago Gomes, CRM 2724/ES.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre ética em pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – situado no Centro de Ciências da Saúde da UFES.

Todas as informações obtidas relativas a sua participação neste estudo serão analisadas em conjunto com aquelas obtidas com outros pacientes, resguardando, desta forma, a confidencialidade da sua participação.

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título do Estudo:** "Tratamento do Alcoolismo pela Neuromodulação Cognitiva Produzida pela Estimulação Transcraniana de Corrente Contínua Repetida sobre o Córtex Pré-Frontal Dorsolateral Esquerdo."

Você leu a informação fornecida?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Você teve a oportunidade de perguntar e discutir o estudo?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Todas as suas perguntas foram respondidas satisfatoriamente?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Você recebeu informações suficientes sobre o estudo?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Com quem você conversou sobre o estudo?		
Você entendeu que é livre para deixar o estudo		
- a qualquer momento?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
- sem ter que dar uma razão?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
- sem comprometer a sua assistência médica futura?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não
Você concorda em participar deste estudo?	<input type="checkbox"/> sim	<input type="checkbox"/> não

**Desta forma, acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:**

\_\_\_\_\_ (data) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura (paciente/representante legal)

\_\_\_\_\_ (data) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa.Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios CRM/ES 4746 Tel. 3335-7337  
Pesquisadora Responsável pelo estudo

\_\_\_\_\_ (data) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Profa.Dra. Maria da Penha Zago Gomes CRM: 2724 Tel. 3335-7442

\_\_\_\_\_ (data) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Dr. Luis Henrique Casagrande CRM/ES 5389 Tel. 3324-6040

Testemunha 1 \_\_\_\_\_ (data) \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

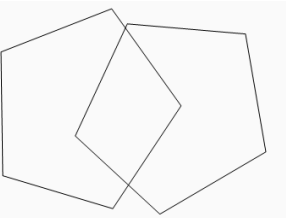
**Obs.:** Caso não seja possível contatar os médicos responsáveis pelo estudo, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo pelo telefone 3335-7211 ou pelo e-mail: [cep.ufes@hotmail.com](mailto:cep.ufes@hotmail.com)



## Anexo V – Bateria de Avaliação Frontal (FAB)

FAB - Bateria de Avaliação Frontal																															
<p><b>1) Semelhanças ( )</b>  Em que se parecem...  a) Banana e Laranja _____  b) Mesa e Cadeira _____  c) Tulipa, rosa e margarida _____</p> <p style="text-align: right;"><b>3 corretas: 3 pontos</b>  <b>2 corretas: 2 pontos</b>  <b>1 correta: 1 ponto</b>  <b>Nenhuma Correta: 0</b></p>																															
<p><b>2) Fluência Verbal ( )</b>  Palavras que começam com a letra "s", não podendo ser nome próprio:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td></tr> <tr><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td></tr> <tr><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td></tr> <tr><td>13</td><td>14</td><td>15</td><td>16</td></tr> <tr><td>17</td><td>18</td><td>19</td><td>20</td></tr> <tr><td>21</td><td>22</td><td>23</td><td>24</td></tr> <tr><td>25</td><td>26</td><td>27</td><td>28</td></tr> </table>				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	2	3	4																												
5	6	7	8																												
9	10	11	12																												
13	14	15	16																												
17	18	19	20																												
21	22	23	24																												
25	26	27	28																												
<p><b>3) Seqüência Motora ( )</b>  Punho, palma, lado (primeiro junto, após sozinho)</p> <p style="text-align: right;"><b>6 séries consecutivas corretas sozinho: 3 pontos</b>  <b>Pelo menos 3 séries consecutivas sozinho: 2 pontos</b>  <b>3 séries consecutivas com o examinador: 1 ponto</b>  <b>Não realiza 3 consecutivas mesmo com examinador: 0</b></p>																															
<p><b>4) Instruções Conflitantes ( )</b>  Bata duas vezes quando eu bater uma 1-1-1  Bata uma vez quando eu bater duas 2-2-2  1-1-2-1-2-2-2-1-1-2</p> <p style="text-align: right;"><b>Nenhum erro: 3 pontos</b>  <b>1 ou 2 erros: 2 pontos</b>  <b>Mais do que 2 erros: 1 ponto</b>  <b>O paciente bate como o examinador por pelo menos 4 vezes consecutivas: 0</b></p>																															
<p><b>5) Go-No-Go ( )</b>  Bata uma vez quando eu bater uma 1-1-1  Não bata quando eu bater duas 2-2-2  1-1-2-1-2-2-2-1-1-2</p> <p style="text-align: right;"><b>Nenhum erro: 3 pontos</b>  <b>1 ou 2 erros: 2 pontos</b>  <b>Mais do que 2 erros: 1 ponto</b>  <b>O paciente bate com o examinador por pelo menos 4 vezes consecutivas: 0</b></p>																															
<p><b>6) Comportamento ( )</b>  Não toque as minhas mãos  (O paciente deve ficar com as mãos no joelho, com palma para cima. Sem nada dizer o examinador coloca suas mãos perto das mãos do paciente, se este toca-las, então o examinador vai dizer: Agora não toque as minhas mãos. A seguir repete a execução)</p> <p style="text-align: right;"><b>Se o paciente não tocar as mãos do examinador: 03 pontos</b>  <b>Se o paciente hesitar e perguntar o que deve fazer: 02 pontos</b>  <b>Se o paciente tocar as mãos do examinador sem hesitar: 01 ponto</b>  <b>O paciente toca a mão do examinador, mesmo após receber a instrução para não tocar: 0</b></p>																															

## Anexo VI - Mini Exame do Estado Mental

Questões	Pontos
1- Qual é: Ano? Estação (Metade do ano)? Data? Dia? Mês?	5
2- Onde estamos: Estado? País? Cidade? Bairro ou Hospital? Andar?	5
3- Nomeie três objetos (carro, vaso, janela)	3
4- Soletre "MUNDO" de trás para frente.	5
5- Peça ao paciente que nomeie os 3 objetos aprendidos na questão 3.	3
6- (caneta relógio). Peça ao paciente que os nomeie	2
7- Peça ao paciente que repita "nem aqui, nem ali, nem lá".	1
8- Obedeça à instrução: "Pegue o papel com sua mão direita. Dobre-o ao meio com as duas mãos. Coloque o papel no chão".	3
9- Ler e obedecer: "Feche os olhos".	1
10- Escreva uma frase de sua escolha.	1
11- Copie o seguinte desenho	1
	
Escore total: (máximo de 30) _____	

## ANEXO VII – Questionários do Padrão de Compulsão (*craving*)

### Compulsão (“Craving”)

#### Itens 1, 2, 4, 5 e 13 da Escala original do beber obsessivo compulsivo (Obsessive Compulsive Drinking Scale – OCDS)

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Aplicador:** \_\_\_\_\_

Instruções: As perguntas abaixo questionam sobre seu consumo de álcool e suas tentativas para controlá-lo. Por favor, faça um círculo em torno do número da alternativa que melhor se aplica a você em cada pergunta.

1.Quanto do seu tempo, quando você não está bebendo, é ocupado com pensamentos, idéias, impulsos ou imagens relacionados à bebida?

- (0) nenhum
- (1) menos de 1 hora por dia
- (2) 1 a 3 horas por dia
- (3) 4 a 8 horas por dia
- (4) mais de 8 horas por dia

2.Com que frequência estes pensamentos surgem?

- (0) nunca
- (1) menos que 8 vezes ao dia
- (2) mais que 8 vezes ao dia, porém a maior parte do meu dia é livre destes pensamentos
- (3) mais que 8 horas por dia e durante a maior parte do dia
- (4) os pensamentos são muito numerosos e uma (1) hora raramente passa sem que vários deles ocorram.

4.Quanta angústia ou perturbação as idéias, pensamentos, impulsos ou imagens relacionados à bebida lhe causam quando você não está bebendo?

- (0) nenhuma
- (1) leve, infrequente, e não muito perturbadores
- (2) moderada, frequente, e perturbadores, mas ainda controlável
- (3) severa, muito frequente, e muito perturbadores
- (4) extrema, quase constante, a angústia é incapacitante.

5.Quanto esforço você faz para resistir a estes pensamentos ou para desviar sua atenção para outro assunto quando os mesmos surgem na sua mente enquanto você não está bebendo? (o que interessa aqui é o esforço feito para resistir aos pensamentos em beber e não o seu sucesso ou fracasso em controlá-los)

- (0) meus pensamentos em beber são tão poucos, eu não preciso impor resistência. Se eu os tenho, eu faço um esforço sempre para resistir
- (1) eu tento resistir a maior parte das vezes
- (2) eu faço algum esforço para resistir
- (3) eu cedo a todos sem tentar controlá-los, mas eu faço isso com alguma relutância
- (4) eu cedo completa e voluntariamente a todos esses pensamentos

13.Qual a sua motivação em consumir bebidas alcoólicas?

- (0) nenhuma motivação
- (1) alguma motivação para beber
- (2) forte motivação para beber
- (3) motivação muito forte para beber
- (4) a motivação para beber é completamente involuntária e irresistível

**Compulsão ("Craving")**  
**Itens 1, 2, 4, 5 e 13 da Escala original do beber obsessivo compulsivo**  
**(Obsessive Compulsive Drinking Scale – OCDS)**

**Adaptação para crack-cocaína**

**Paciente:** \_\_\_\_\_

**Aplicador:** \_\_\_\_\_

Instruções: As perguntas abaixo questionam sobre seu consumo de crack e suas tentativas para controlá-lo. Por favor, faça um círculo em torno do número da alternativa que melhor se aplica a você em cada pergunta.

1.Quanto do seu tempo, quando você não está usando, é ocupado com pensamentos, idéias, impulsos ou imagens relacionados ao crack?

- (0) Nenhum
- (1) menos de 1 hora por dia
- (2) 1 a 3 horas por dia
- (3) 4 a 8 horas por dia
- (4) mais de 8 horas por dia

2.Com que frequência estes pensamentos surgem?

- (0) nunca
- (1) menos que 8 vezes ao dia
- (2) mais que 8 vezes ao dia, porém a maior parte do meu dia é livre destes pensamentos
- (3) mais que 8 horas por dia e durante a maior parte do dia
- (4) os pensamentos são muito numerosos e uma (1) hora raramente passa sem que vários deles ocorram.

4.Quanta angústia ou perturbação as idéias, pensamentos, impulsos ou imagens relacionados ao crack lhe causam quando você não está usando?

- (0) nenhuma
- (1) leve, infrequente, e não muito perturbadores
- (2) moderada, freqüente, e perturbadores, mas ainda controlável
- (3) severa, muito freqüente, e muito perturbadores
- (4) extrema, quase constante, a angústia é incapacitante.

5.Quanto esforço você faz para resistir a estes pensamentos ou para desviar sua atenção para outro assunto quando os mesmos surgem na sua mente enquanto você não está usando? (o que interessa aqui é o esforço feito para resistir aos pensamentos em beber e não o seu sucesso ou fracasso em controlá-los)

- (0) meus pensamentos em usar são tão poucos, eu não preciso impor resistência. Se eu os tenho, eu faço um esforço sempre para resistir
- (1) eu tento resistir a maior parte das vezes
- (2) eu faço algum esforço para resistir
- (3) eu cedo a todos sem tentar controlá-los, mas eu faço isso com alguma relutância
- (4) eu cedo completa e voluntariamente a todos esses pensamentos

13.Qual a sua motivação em consumir crack?

- (0) nenhuma motivação
- (1) alguma motivação para usar
- (2) forte motivação para usar
- (3) motivação muito forte para usar
- (4) a motivação para usar é completamente involuntária e irresistível

## ANEXO VIII – Escala de HAM - D

Assinale o item que melhor caracteriza o paciente na semana anterior  
e anote o número no local apropriado.

**ESCORE**

<b>1. HUMOR DEPRIMIDO (tristeza, desesperança, desamparo, inutilidade)</b>		
0. Ausente	3. Comunica os sentimentos não com palavras, isto é, com a expressão facial, a postura, a voz e a tendência ao choro	<input type="text"/>
1. Sentimentos relatados apenas ao ser inquirido	4. Sentimentos deduzidos de comunicação verbal e não verbal do paciente	
2. Sentimentos relatados espontaneamente, com palavras		
<b>2. SENTIMENTOS DE CULPA</b>		
0. Ausentes	3. A doença atual é um castigo. Delírio de culpa	<input type="text"/>
1. Auto-recriminação: sente que decepcionou os outros	4. Ouve vozes de acusação ou denúncia e/ou tem alucinações visuais ameaçadoras	
2. Idéias de culpa ou ruminção sobre erros passados ou más ações		
<b>3. SUICÍDIO</b>		
0. Ausente	3. Idéias ou gestos suicidas	<input type="text"/>
1. Sente que a vida não vale a pena	4. Tentativa de suicídio (qualquer tentativa seria marcar 4)	
2. Deseja estar morto ou pensa na possibilidade de sua própria morte		
<b>4. INSÔNIA INICIAL</b>		
0. Sem dificuldade para conciliar o sono	2. Queixa-se de dificuldade para conciliar o sono todas as noites	<input type="text"/>
1. Queixa-se de dificuldade ocasional para conciliar o sono, isto é, mais de meia hora		
<b>5. INSÔNIA INTERMEDIÁRIA</b>		
0. Sem dificuldade	2. Acorda à noite — qualquer saída da cama marcar 2 (exceto para urinar)	<input type="text"/>
1. O paciente se queixa de inquietude e perturbação durante a noite		
<b>6. INSÔNIA TARDIA</b>		
0. Sem dificuldade	2. Incapaz de voltar a conciliar o sono ao deixar a cama	<input type="text"/>
1. Acorda de madrugada, mas volta a dormir		
<b>7. TRABALHO E ATIVIDADES</b>		
0. Sem dificuldade	3. Diminuição do tempo gasto em atividades ou queda de produtividade. No hospital, marcar 3 se o paciente não passar ao menos três horas por dia em atividades externas (trabalho hospitalar ou passatempos)	<input type="text"/>
1. Pensamento e sentimentos de incapacidade, fadiga ou fraqueza relacionada a atividades: trabalho ou passatempos	4. Parou de trabalhar devido à doença atual. No hospital, marcar 4 se o paciente não se ocupar de outras atividades além de pequenas tarefas do leito, ou for incapaz de realizá-las sem ajuda	
2. Perda de interesse por atividades (passatempos ou trabalho — quer diretamente relatada pelo paciente, quer indiretamente, por desatenção, indecisão e vacilação (sente que precisa esforçar-se para o trabalho ou atividade)		
<b>8. RETARDO (lentidão de idéias e fala; dificuldade de concentração; atividade motora diminuída)</b>		
0. Pensamento e fala normais	2. Retardo óbvio à entrevista	<input type="text"/>
1. Leve retardo à entrevista	3. Estupor completo	
<b>9. AGITAÇÃO</b>		
0. Nenhuma	2. Torce as mãos, rói as unhas, puxa os cabelos, morde os lábios	<input type="text"/>
1. Brinca com as mãos, com os cabelos, etc		
<b>10. ANSIEDADDE PSÍQUICA</b>		
0. Sem ansiedade	3. Atitude apreensiva aparente no rosto ou na fala	<input type="text"/>
1. Tensão e irritabilidade subjetivas	4. Medos expressos sem serem inquiridos	
2. Preocupação com trivialidades		
<b>Subtotal</b>		<input type="text"/>

Subtotal anterior

**11. ANSIEDADE SOMÁTICA**

Concomitantes fisiológicos da ansiedade tais como:  
 Gastrointestinais: boca seca, flatulência, indigestão, diarreia, cólicas, eructações  
 Cardiovasculares: palpitações, cefaléias  
 Respiratórias: hiperventilação, sufocação  
 Frequência urinária  
 Sudorese

0. Ausente  
 1. Leve  
 2. Moderada  
 3. Grave  
 4. Incapacitante

**12. SINTOMAS SOMÁTICOS GASTROINTESTINAIS**

0. Nenhum  
 1. Perda de apetite, mas alimenta-se voluntariamente.  
 Sensações de peso no abdômen

2. Dificuldade de comer se não insistirem. Solicita ou exige laxativos ou medicações para os intestinos ou para sintomas digestivos

**13. SINTOMAS SOMÁTICOS EM GERAL**

0. Nenhum  
 1. Peso nos membros, nas costas ou na cabeça. Dores nas costas, cefaléia, mialgias. Perda de energia e cansaço

2. Qualquer sintoma bem caracterizado e nítido marcar 2

**14. SINTOMAS GENITAIS**

Sintomas como: perda de libido, distúrbios menstruais.  
 0. Ausentes

1. Leves distúrbios menstruais  
 2. Intensos

**15. HIPOCONDRIA**

0. Ausente  
 1. Auto-observação aumentada (com relação ao corpo)  
 2. Preocupação com a saúde

3. Queixas frequentes, pedidos de ajuda, etc  
 4. Ideias delirantes hipocôndricas

**16. PERDA DE PESO (Marcar A ou B)**

- A. Quando avaliada pela história clínica:  
 0. Sem perda de peso  
 1. Provável perda de peso associada a moléstia atual  
 2. Perda de peso definida (de acordo com o paciente)

- B. Avaliada semanalmente pelo psiquiatra responsável, quando são medidas alterações reais de peso:  
 0. Menos que 0,5 kg de perda por semana  
 1. Mais que 0,5 kg de perda por semana  
 2. Mais que 1 kg de perda por semana

**17. CONSCIÊNCIA DA DOENÇA**

0. Reconhece que está doente  
 1. Reconhece a doença mas atribui a causa à má alimentação, ao clima, ao excesso de trabalho, a vírus, à necessidade de repouso, etc

2. Nega estar doente

**18. VARIAÇÃO DIURNA**

Observar se os sintomas são piores pela manhã ou à noite.  
 Caso não haja variação, marcar "nenhuma".

0. Nenhuma  
 1. Leve  
 2. Grave

**19. DESPERSONALIZAÇÃO E DESREALIZAÇÃO**

Tais como: sensações de realidade, ideias nihilistas.  
 0. Ausentes  
 1. Leves

2. Moderadas  
 3. Graves  
 4. Incapacitantes

**20. SINTOMAS PARANÓIDES**

0. Nenhum  
 1. Desconfiança

2. Ideias de referência  
 3. Delírio de referência e perseguição

**21. SINTOMAS OBSESSIVOS E COMPULSIVOS**

0. Nenhum  
 1. Leves  
 2. Graves

ESCORE TOTAL

## ANEXO IX – Escala de HAM - A

### *ESCALA DE AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE DE HAMILTON*

Protocolo Nº. \_\_\_\_\_

Iniciais do paciente: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Instruções:** Esta lista de verificação é para auxiliar o clínico ou psiquiatra na avaliação de cada paciente de acordo com o seu grau de ansiedade e condição patológica. Preencha com o grau apropriado, na casela correspondente ao lado de cada item, na coluna à direita.

**GRAUS: Nenhum = 0; Leve = 1; Médio = 2; Forte = 3; Máximo = 4**

Nº	ITEM	COMPORTAMENTO	GRAU
1	Humor Ansioso	Preocupações, previsão do pior, antecipação temerosa, irritabilidade, etc.	
2	Tensão	Sensações de tensão, fadiga, reação de sobressalto, comove-se facilmente, tremores, incapacidade para relaxar e agitação.	
3	Medos	De escuro, de estranhos, de ficar sozinho, de animais, de trânsito, de multidões, etc. (avaliar qualquer um por intensidade e frequência de exposição).	
4	Insônia	Dificuldade em adormecer, sono interrompido, insatisfeito e fadiga ao despertar, sonhos penosos, pesadelos, terrores noturnos, etc.	
5	Intelectual (cognitivo)	Dificuldade de concentração, falhas de memória, etc.	
6	Humor Deprimido	Perda de interesse, falta de prazer nos passatempos, depressão, despertar precoce, oscilação do humor, etc.	
7	Somatizações Motoras	Dores musculares, rigidez muscular, contrações espásticas, contrações involuntárias, ranger de dentes, voz insegura, etc.	
8	Somatizações Sensoriais	Ondas de frio ou calor, sensações de fraqueza, visão turva, sensação de picadas, formigamento, câimbras, dormências, sensações auditivas de tinidos, zumbidos, etc.	
9	Sintomas Cardiovasculares	Taquicardia, palpitações, dores torácicas, sensação de desmaio, sensação de extra-sístoles, latejamento dos vasos sanguíneos, vertigens, batimentos irregulares, etc.	
10	Sintomas Respiratórios	Sensações de opressão ou constricção no tórax, sensações de sufocamento ou asfixia, suspiros, dispnéia, etc.	
11	Sintomas Gastrointestinais	Deglutição difícil, aerofagia, dispepsia, dores abdominais, ardência ou azia, dor pré ou pós-prandial, sensações de plenitude ou de vazio gástrico, náuseas, vômitos, diarreia ou constipação, pirose, meteorismo, náusea, vômitos, etc.	
12	Sintomas Geniturinários	Polaciúria, urgência da micção, amenorréia, menorragia, frigidez, ereção incompleta, ejaculação precoce, impotência, diminuição da libido, etc.	
13	Sintomas Autonômicos	Boca seca, rubor, palidez, tendência a sudorese, mãos molhadas, inquietação, tensão, dor de cabeça, pêlos eriçados, tonteiras, etc.	
14	Comportamento na Entrevista	Tenso, pouco à vontade, inquieto, a andar a esmo, agitação das mãos (tremores, remexer, cacoetes) franzir a testa e face tensa, engolir seco, arrotos, dilatação pupilar, sudação, respiração suspirosa, palidez facial, pupilas dilatadas, etc.	
		<b>ESCORE TOTAL:</b>	

**Observação:** Conforme se pode constatar, esta *Escala de Ansiedade de Hamilton* (1959) compreende 14 itens distribuídos em dois grupos, sendo o primeiro grupo, com 7 itens, relacionado a sintomas de humor ansioso e o segundo grupo, também com 7 itens, relacionado a sintomas físicos de ansiedade – o que possibilita obter escores parciais, ou seja, separadamente para cada grupo de itens. O escore total é obtido pela soma dos valores (graus) atribuídos em todos os 14 itens da escala, cujo resultado varia de 0 a 56. Esta escala deve ser aplicada pelo profissional